

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ ΣΕ ΜΥΪΚΑ ΚΑΙ  
ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ»**



**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΓΚΟΥΤΖΟΥΡΕΛΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ**

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2016**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**«ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ ΣΕ ΜΥΙΚΑ ΚΑΙ  
ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ»**

**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΓΚΟΥΤΖΟΥΡΕΛΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ**

**ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ**

**ΛΑΡΙΣΑ 2016**

**«Μελέτη της επίδρασης εκχυλισμάτων σταφυλίου σε μυϊκά και  
ενδοθηλιακά κύτταρα με συνδυασμό μοριακών τεχνικών»**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ** (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Γ. ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ** : Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική , Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Δ. ΣΤΑΓΚΟΣ**: Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

**Δ. ΚΟΥΡΕΤΑΣ** (ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Γ. ΑΜΟΥΤΖΙΑΣ** : Επίκουρος Καθηγητής Βιοπληροφορικής στη Γενωμική , Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Δ. ΣΤΑΓΚΟΣ**: Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Σ. ΧΑΡΟΥΤΟΥΝΙΑΝ**: Καθηγητής Χημείας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Β. ΚΑΡΑΘΑΝΟΣ**: Καθηγητής Φυσικοχημείας και Μηχανικής Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

**Γ. ΔΕΔΟΥΣΗΣ**: Καθηγητής Κυτταρικής και Μοριακής Βιολογίας του Ανθρώπου, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο

**Α. ΤΣΑΚΑΛΩΦ**: Αναπληρωτής Καθηγητής Ιατρικής Χημείας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας





ΓΚΟΥΤΖΟΥΡΕΛΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2016

“ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΣΤΑΦΥΛΙΟΥ ΣΕ ΜΥΙΚΑ ΚΑΙ  
ΕΝΔΟΘΗΛΙΑΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ ΜΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ”

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

*Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 25*

*Συνολικός αριθμός σελίδων: 299*

*Συνολικός αριθμός εικόνων: 44*

*Συνολικός αριθμός πινάκων: 8*

*Συνολικός αριθμός βιβλιογραφικών παραπομπών: 317*

## Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά τα έτη 2012-2015 στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών - Τοξικολογίας, κ. Δημήτριου Κουρέτα.

### *Γενικά στοιχεία, σκοπός και σημασία της μελέτης*

Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει αποκτήσει η χρησιμοποίηση φυτικών εκχυλισμάτων πλούσιων σε βιοδραστικά στοιχεία. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την κατανάλωση σταφυλιών και κρασιού με ευεργετικές επιδράσεις σε χρόνιες παθήσεις όπως διάφορες μορφές καρκίνου, καρδιαγγειακές παθήσεις, διαβήτη και παχυσαρκία. Οι ευεργετικές ιδιότητες αποδίδονται στα περιεχόμενα βιοδραστικά συστατικά τους και κυρίως στη πολυφαινολική τους σύσταση. Ο σκοπός της έρευνας ήταν η μελέτη των αντιοξειδωτικών μηχανισμών δράσης ενός εκχυλίσματος στεμφύλων σταφυλιού (*Vitis Vinifera*), της τοπικής Θεσσαλικής ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου καθώς και τριών εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιού από διάφορες ποικιλίες ελληνικών σταφυλιών. Περισσότερη έμφαση δόθηκε στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων σε μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα εκχυλίσματα αυτά μπορούν να αποτελέσουν πηγή σημαντικών χημειοπροστατευτικών παραγόντων ή να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρωματικοί παράγοντες στη διατροφή.

## Ερωτήματα

Τα βασικά ερωτήματα της έρευνας ήταν τα ακόλουθα:

1. Ένα εκχύλισμα στεμφύλων σταφυλιού με αποδεδειγμένη ισχυρή αντιοξειδωτική δράση *in vitro* είναι ικανό να ασκήσει προστατευτική - αντιοξειδωτική δράση σε μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα που εκτέθηκαν σε οξειδωτικό παράγοντα; Αν ναι, μέσω ποιων κυτταρικών μοριακών μηχανισμών μπορεί να βελτιώσει την οξειδοαναγωγική κατάσταση μυϊκών και ενδοθηλιακών κυττάρων;
2. Η αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιού σε μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα εξαρτάται από την ποσοτική τους σύσταση σε πολυφαινόλες ή η ποιοτική τους σύσταση σε πολυφαινόλες παίζει σημαντικότερο ρόλο;
3. Το εκχύλισμα στεμφύλων σταφυλιού μπορεί να δράσει αντιοξειδωτικά επηρεάζοντας τους μηχανισμούς της γονιδιακής έκφρασης των μυϊκών κυττάρων. Αν ναι ποια γονίδια επηρεάζονται περισσότερο και ποιος είναι ο ρόλος τους;

## Επεξήγηση όρων

Ελεύθερη ρίζα: Χαρακτηρίζεται ένα μόριο ή άτομο το οποίο περιέχει ένα ή περισσότερα μονήρη, ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα.

Αντιοξειδωτικό: Χαρακτηρίζεται οποιαδήποτε ένωση, η οποία όταν βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση από το προς οξείδωση υπόστρωμα έχει την ικανότητα να παρεμποδίζει ή να αναστέλλει την οξείδωση του υποστρώματος.

Οξειδωτικό στρες: Η διαταραχή στην ισορροπία μεταξύ των οξειδωτικών και των αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων.

Εκχύλισμα στεμφύλων σταφυλίου: Εκχύλισμα που προκύπτει από το υπόλειμμα που μένει μετά την έκθλιψη των σταφυλιών και αποτελείται από τους βοστρύχους, τα γίγαρτα και τους φλοιούς των σταφυλιών.

*Δημοσιεύσεις που προέκυψαν από τη διδακτορική διατριβή:*

- **Goutzourelas N**, Stagos D, Demertzis N, Mavridou P, Karterolioti H, Georgadakis S, Kerasioti E, Aligiannis N, Skaltsounis L, Statiri A, Tsioutsouliti A, Tsatsakis AM, Hayes AW, Kouretas D (2014). Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. Hum Exp Toxicol. 33, 1099-112.
- **Goutzourelas N**, Stagos D, Housmekeridou A, Karapoulidou C, Kerasioti E, Aligiannis N, Skaltsounis AL, Spandidos DA, Tsatsakis AM, Kouretas D (2015). Grape pomace extract exerts antioxidant effects through an increase in GCS levels and GST activity in muscle and endothelial cells. Int J Mol Med. 36, 433-41.
- **Goutzourelas N**, Stagos D, Spanidis Y, Liosi M, Apostolou A, Priftis A, Haroutounian S, Spandidos DA, Tsatsakis AM, Kouretas D. Polyphenolic composition of grape stem extracts affects antioxidant activity in endothelial and muscle cells. Mol Med Rep. 12, 5846-56.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία είκοσι χρόνια αρκετά εκχυλίσματα σταφυλιών και άλλα προϊόντα των σταφυλιών όπως το κρασί ήταν στο επίκεντρο μελετών λόγω των ισχυρών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους. Πολλές από αυτές έχουν μελετήσει την ικανότητα διαφόρων εκχυλισμάτων σταφυλιού να ασκούν αντιοξειδωτική δράση. Αρκετές δείχνουν ότι τα εκχυλίσματα ενισχύουν τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων με διάφορους τρόπους που εξαρτώνται από την σύστασή τους. Ωστόσο δεν είναι διευκρινισμένος ο τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται αυτή η ενίσχυση. Στην εργασία αυτή, η χορήγηση εκχυλίσματος στεμφύλων σταφυλιού της τοπικής ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου σε μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα οδήγησε σε βελτίωση της οξειδοαναγωγικής τους κατάστασης. Το εκχύλισμα εμφάνισε ικανότητα προστατευτική για τα κύτταρα έναντι οξειδωτικής βλάβης, βελτιώνοντας τους δείκτες οξειδωτικού στρες και συγκεκριμένα αυξάνοντας την γλουταθειόνη (GSH) στα κύτταρα. Η αύξηση της GSH και η βελτίωση των δεικτών οξειδωτικού στρες πιθανόν να προήλθε από την ικανότητα του εκχυλίσματος να επηρεάζει τα επίπεδα και την δραστικότητα διαφόρων αντιοξειδωτικών ενζύμων. Βρέθηκε ότι το εκχύλισμα προκάλεσε μια αύξηση των επιπέδων της συνθετάσης της γ-γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS) και της δραστικότητας της μεταφοράς της γλουταθειόνης (GST) και στις δυο κυτταρικές σειρές. Πρόκειται για δυο ένζυμα που εμπλέκονται στον μεταβολισμό της γλουταθειόνης. Γενικά αυτά τα αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι το σύστημα της GSH παίζει έναν κρίσιμο ρόλο στην αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος. Όσον αφορά την μελέτη εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιού από τρεις διαφορετικές ποικιλίες παρατηρήθηκε ότι η αντιοξειδωτική τους δράση στα μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα εξαρτάται από την ποιοτική τους σύσταση σε πολυφαινόλες. Συγκεκριμένα τα διάφορα εκχυλίσματα επηρέασαν διαφορετικά τους δείκτες οξειδωτικού στρες των κυττάρων παρόλο που χορηγήθηκαν ίδιες συγκεντρώσεις πολυφαινολών. Τα παραπάνω ενισχύουν την άποψη ότι η σύσταση σε συγκεκριμένες πολυφαινόλες ή αναλογίες πολυφαινολών μπορεί να επηρεάσει την αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων. Επιπλέον η μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος στην γονιδιακή έκφραση μυϊκών κυττάρων έδειξε ότι αρκετά γονίδια υπερεκφράστηκαν και κάποια υποεκφράστηκαν. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι μια σειρά γονιδίων υπερεκφράστηκαν ή υποεκφράστηκαν πάνω από 1,5

φορές. Επίσης τα γονίδια που κωδικοποιούν μια σειρά ισομορφών της GST αλλά και το γονίδιο της GCS παρουσίασαν αυξημένη έκφραση. Το γεγονός αυτό δημιουργεί νέα ερωτήματα για τους μηχανισμούς με τους οποίους μπορεί να δράσει ένα εκχύλισμα.

## ABSTRACT

For the past twenty years several grape extracts and other grape products such as wine have been the focus of many studies due to their strong antioxidant properties. Several studies show that grape extracts enhance the cellular antioxidant mechanisms differentially depending on their composition. However, the exact mechanism by which the extracts function remains elusive. In the current paper, the administration of grape pomace extract from the local variety "Batiki Tirnavos" in muscle and endothelial cells led to an improvement in their redox status. The extract displayed a capacity to protect the cells against oxidative damage by improving oxidative stress markers, namely increasing glutathione (GSH) levels in cells. The increase in GSH and improvement on oxidative stress markers may be attributed to the extract's ability to affect the levels and/or the activity of several antioxidant enzymes. It was found that the extract induced an increase in the levels of  $\gamma$ -glutamyl-cysteine synthetase (GCS) and the activity of glutathione transferase (GST) in both cell lines. These two enzymes are involved in the metabolism of glutathione. Overall these results suggest that the GSH system plays a critical role in the antioxidant activity of the extract. Regarding the study of grape stem extracts deriving from three different varieties, it was observed that the antioxidant activity in muscle and endothelial cells depends on their qualitative composition of polyphenols. Specifically, various extracts differently affected oxidative stress cell markers even though same concentrations of polyphenols were used. All these fortify the view that specific polyphenols or polyphenolic proportions can affect the antioxidant activity of the extracts. A further analysis on the effect of the extract on muscle cell gene expression showed that several genes were overexpressed, while some were downexpressed. Interestingly, a number of genes displayed over 1,5 fold over- or down-expression. This raises new questions concerning the mechanisms by which an extract acts.



## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Δημήτριο Κουρέτα που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω την διδακτορική μου διατριβή στο εργαστήριό του. Κατά τα χρόνια της συνεργασίας μας συνέβαλε στην βελτίωση του τρόπου σκέψης και της κρίσης μου. Με βοήθησε να ξεπεράσω αδυναμίες του παρελθόντος και μου δίδαξε τι σημαίνει αντοχή σε όλα τα επίπεδα.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτρη Στάγκο που συνέβαλε με τις γνώσεις και την εμπειρία του, στην επίλυση των διαφόρων τεχνικών προβλημάτων που συνάντησα. Ήταν πάντα δίπλα μου και έπαιξε σημαντικό ρόλο καθόλη την διάρκεια της διατριβής μου.

Εκφράζω ακόμα τις ευχαριστίες μου στον επίκουρο καθηγητή κ. Γρηγόριο Αμούτζια για τις υποδείξεις του αλλά και σε όλα τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής που δέχτηκαν να διαβάσουν και να κρίνουν την διδακτορική μου διατριβή.

Για την ολοκλήρωση της διατριβής συνέβαλε ένας αριθμός ατόμων που θα ήθελα να ευχαριστήσω. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους συναδέλφους Νικόλαο Δεμερτζή, Παρασκευή Μαυρίδου, Στέφανο Γεωργαδάκη, Χρυσανγή Καρτερολιότη, Αργυρώ Στατήρη, Αθανασία Τσιουτσιουλίτη, Χριστίνα Καραπούλιου, Αναστασία Χουσμεκερίδου και Μαρία Λιόση για την πολύ καλή συνεργασία τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ξεχωριστά τους συναδέλφους Ευθαλία Κερασιώτη, Κωνσταντίνο Γερασόπουλο, Υπάτιο Σπανίδη, Αλέξανδρο Πρίφτη, Δέσποινα Καραγκίνη και Σωτηρίνα Μακρή για την άψογη συνεργασία τους, την φιλία τους και τη βοήθεια που μου προσέφεραν όποτε τη χρειαζόμουν. Επίσης ευχαριστώ τον Αναστάσιο Μπέσιο που ξενυχτήσαμε παρέα πολλά βράδια στο εργαστήριο αλλά και την Μαρίνα Ορφανού που με στάθηκε δίπλα μου στο δύσκολο έργο της συγγραφής.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου, γονείς και παππούδες που από μικρό παιδί ανέπτυξαν στο μυαλό μου την αξία της γνώσης.

*Δύο δρόμοι ανοίγονταν στο δάσος*

*κι εγώ ακολούθησα τον λιγότερο περπατημένο.*

Robert Frost

*Σε όσους μόχθησαν*

*γι αυτούς που αγαπούν.*

## Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	vii
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	x
ABSTRACT	xi
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1</b> <b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ</b>	<b>1</b>
<b>1.</b> <b>Ελεύθερες ρίζες</b>	<b>2</b>
<b>1.1.</b> <b>Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)</b>	<b>4</b>
1.1.1. <i>Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου</i>	5
1.1.2 <i>Μη ρίζες του οξυγόνου</i>	8
<b>1.2.</b> <b>Πηγές παραγωγής δραστικών μορφών οξυγόνου</b>	<b>10</b>
1.2.1. <i>Ενδοκυτταρικές πηγές</i>	11
1.2.2. <i>Εξωκυτταρικές πηγές</i>	16
<b>1.3.</b> <b>Βιολογική δράση των ROS</b>	<b>21</b>
<b>1.4.</b> <b>Οξειδωτικό στρες</b>	<b>21</b>
<b>2.</b> <b>Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί</b>	<b>22</b>
<b>2.1.</b> <b>Ενζυμικοί αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί</b>	<b>23</b>
2.1.1. <i>Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)</i>	23
2.1.2. <i>Καταλάση (CAT)</i>	24
2.1.3. <i>Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)</i>	25
2.1.4. <i>Αναγωγάση της γλουταθειόνης (GR)</i>	25
2.1.5. <i>Οξυγενάση της αίμης (OH-1)</i>	26
2.1.6. <i>Τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST)</i>	28
2.1.7 <i>Συνθετάση της γλουταθειόνης (GCL)</i>	28
<b>2.2.</b> <b>Μη ενζυμικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας</b>	<b>30</b>
2.2.1. <i>Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C)</i>	30
2.2.2. <i>Βιταμίνη E</i>	31

2.2.3.	Καροτενοειδή	32
2.2.4.	Γλουταθειόνη	33
2.2.5.	Συνένζυμο Q	36
2.2.6.	Ουρικό οξύ	37
2.2.7.	Χολερυθρίνη	38
<b>3.</b>	<b>Πολυφαινόλες</b>	<b>38</b>
<b>3.1.</b>	<b>Κατηγορίες πολυφαινολών</b>	<b>39</b>
3.1.1.	Φλοβονοειδή	40
3.1.2.	Φλαβανόλες	41
3.1.3	Φλαβόνες	41
3.1.4	Φλαβανόλες	41
3.1.5.	Φλαβονόνες	42
3.1.6.	Ισοφλαβόνες	42
3.1.7.	Ανθοκυανιδίνες	42
3.1.8.	Πολυφαινολικά οξέα	45
3.1.9	Στιλβένια	46
3.1.10.	Λιγνάνες	47
<b>3.2.</b>	<b>Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολών</b>	<b>48</b>
<b>3.3.</b>	<b>Προ-οξειδωτική δράση πολυφαινολών</b>	<b>52</b>
<b>4.</b>	<b>Σταφύλια</b>	<b>56</b>
<b>4.1.</b>	<b>Ανατομία Σταφυλιού</b>	<b>59</b>
<b>4.2.</b>	<b>Βιολογικές ιδιότητες</b>	<b>60</b>
<b>4.3.</b>	<b>Εκχυλίσματα σταφυλιού</b>	<b>62</b>
	<b>ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ</b>	<b>66</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2</b>	<b>Επίδραση πολυφαινολικού εκχυλίσματος στεμφύλων της ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό μυϊκών και ενδοθηλιακών κυττάρων</b>	<b>68</b>

<b>2.1.</b>	<b>Γενικά</b>	<b>69</b>
2.1.1.	Μυϊκά κύτταρα C2C12	71
2.1.2.	Ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926	72
2.1.3.	Μηχανισμός δράσης του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP	72
<b>2.2.</b>	<b>Υλικά και μέθοδοι</b>	<b>73</b>
2.2.1.	Παρασκευή του εκχυλίσματος στεμφύλων σταφυλιού ra της ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου	73
2.2.2.	Καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών C2C12 και EA.hy926	74
2.2.3.	Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος και του οξειδωτικού παράγοντα tBHP με τη μέθοδο ΧΤΤ	75
2.2.4.	Πειραματικός σχεδιασμός της μελέτης της επίδρασης του εκχυλίσματος στα επίπεδα των δεικτών του οξειδωτικού στρες και της χορήγησης του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP	77
2.2.5.	Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH και των ROS με κυτταρομετρία ροής	79
2.2.6.	Προσδιορισμός των επιπέδων των TBARS	83
2.2.7.	Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων	84
2.2.8.	Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford	86
2.2.9.	Στατιστική ανάλυση	87
<b>2.3.</b>	<b>Αποτελέσματα</b>	<b>87</b>
2.3.1.	Πολυφαινολικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος στεμφύλων	87
2.3.2.	Επίδραση του εκχυλίσματος σταφυλιού στη βιωσιμότητα των C2C12 και EA.hy926 κύτταρων	89
2.3.3.	Επιδράσεις της χορήγησης εκχυλίσματος στεμφύλων σε δείκτες οξειδωτικού στρες στα C2C12 κύτταρα	91
2.3.4.	Επιδράσεις της χορήγησης εκχυλίσματος στεμφύλων σε δείκτες οξειδωτικού στρες στα EA.hy926 κύτταρα	93
2.3.5.	Προστατευτικές επιδράσεις του εκχυλίσματος στεμφύλων έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από το tBHP στα κύτταρα C2C12	96

2.3.6.	Προστατευτικές επιδράσεις του εκχυλίσματος στεμφύλων έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από το tBHP στα κύτταρα EA.hy926	99
<b>2.4.</b>	<b>Συζήτηση</b>	<b>102</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3:</b>	<b>Προσδιορισμός της επίδρασης του εκχυλίσματος στεμφύλων σταφυλιού της ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου στην έκφραση και δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων στα μυϊκά κύτταρα C2C12 και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926</b>	<b>109</b>
3.1.	Γενικά	110
3.2.	Υλικά και μέθοδοι	113
3.2.1.	Προετοιμασία του εκχυλίσματος	113
3.2.2.	Συνθήκες καλλιέργειας κυττάρων	114
3.2.3.	Κατεργασία των κυττάρων με εκχύλισμα στεμφύλων	115
3.2.4.	Ανάλυση Western blot για την μελέτη των επιπέδων των SOD, HO-1, CAT και GCS πρωτεϊνών	118
3.2.5	Προσδιορισμός της δραστικότητας CAT	119
3.2.6.	Προσδιορισμός της δραστικότητας της GST	120
3.2.7.	Προσδιορισμός της δραστικότητας SOD	121
3.2.8.	Στατιστική ανάλυση	122
<b>3.3.</b>	<b>Αποτελέσματα</b>	<b>123</b>
3.3.1.	Ανάλυση Western blot για τον έλεγχο των επιπέδων των ενζύμων SOD, HO-1, CAT, GCS	123
3.3.2.	Αξιολόγηση της δραστικότητας της GST	127
3.3.3.	Αξιολόγηση της δραστικότητας της CAT	127
3.3.4.	Αξιολόγηση της δραστικότητας της SOD	128
<b>3.4.</b>	<b>Συζήτηση</b>	<b>131</b>
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4:</b>	<b>Η πολυφαινολική σύσταση εκχυλισμάτων βοστρύχων επηρεάζει την αντιοξειδωτική τους δράση σε μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα.</b>	<b>137</b>
<b>4.1.</b>	<b>Γενικά</b>	<b>138</b>
<b>4.2.</b>	<b>Υλικά και Μέθοδοι</b>	<b>140</b>

4.2.1.	Παρασκευή των εκχυλισμάτων	140
4.2.2.	Μέθοδοι προσδιορισμού του συνολικού πολυφαινολικού περιεχόμενου και της <i>in vitro</i> αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων	142
4.2.2.α.	Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχόμενου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu	142
4.2.2.β.	Προσδιορισμός της πολυφαινολικής σύστασης των εκχυλισμάτων με HPLC	144
4.2.2.γ.	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH•	145
4.2.2.δ.	Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα ABTS•+	148
4.2.2.ε.	Προσδιορισμός αναγωγικής ικανότητας	149
4.2.3.	Στατιστική ανάλυση	150
4.2.4.	Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας	151
4.2.5.	Προσδιορισμός της κυτταρικής βιωσιμότητας	151
4.2.6.	Επεξεργασία των κυττάρων EA.hy926 και C2C12 με τα εκχυλίσματα βοστρύχων σταφυλιού	152
4.2.7.	Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής για τον προσδιορισμό των επιπέδων της GSH και των ROS	153
4.2.8.	Αξιολόγηση των επιπέδων TBARS με φασματοφωτομετρία	154
4.2.9.	Αξιολόγηση των επιπέδων CARB με φασματοφωτομετρία	155
4.2.10.	Στατιστική ανάλυση	156
<b>4.3.</b>	<b>Αποτελέσματα</b>	156
4.3.1.	Πολυφαινολική σύσταση των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιού	156
4.3.2.	Εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών	158
4.3.3.	Reducing Power	159
4.3.4.	Επιπτώσεις της χορήγησης των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών στη βιωσιμότητα των κυττάρων C2C12 και EA.hy926	162
4.3.5.	Επίδραση της χορήγησης των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών στα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες σε κύτταρα EA.hy926	164

4.3.6.	Επίδραση της χορήγησης εκχυλίσματος βοστρύχων σταφυλιών στα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες σε κύτταρα C2C12	167
<b>4.4.</b>	<b>Συζήτηση</b>	169
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5:</b>	<b>Μελέτη της επίδρασης εκχυλίσματος στεμφύλων σταφυλιών στην γονιδιακή έκφραση μυικών κυττάρων με χρήση DNA μικροσυστοιχιών (DNA Microarrays)</b>	176
<b>5.1.</b>	<b>Γενικά</b>	177
<b>5.2.</b>	<b>Υλικά και Μέθοδοι</b>	178
5.2.1.	Προετοιμασία του εκχυλίσματος	178
5.2.2.	Συνθήκες καλλιέργειας κυττάρων	178
5.2.3.	Κατεργασία των κυττάρων με εκχύλισμα στέμφυλων	179
5.2.4.	Απομόνωση RNA από τα κύτταρα C2C12 μετά από επώασή τους με το εκχύλισμα στεμφύλων σταφυλιού της ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου	179
5.2.5.	Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης με ανάλυση με DNA μικροσυστοιχίες (DNA microarrays analysis) στα κύτταρα C2C12 μετά από επώασή τους με το εκχύλισμα στεμφύλων σταφυλιού της ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου	181
<b>5.3.</b>	<b>Αποτελέσματα</b>	183
5.3.1.	Διαφορές στην έκφραση των γονιδίων (Fold change analysis)	183
5.3.2.	Διαφορές στην έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων (Fold change analysis)	185
<b>5.4.</b>	<b>Συζήτηση</b>	186
	Συμπεράσματα-προοπτικές	200
	<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	202



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1.</b>	Δραστικές μορφές οξυγονου	5
<b>Εικόνα 2.</b>	Παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την αναπνευστική αλυσίδα	12
<b>Εικόνα 3.</b>	Η οξειδωτική έκρηξη κατά τη φλεγμονή	14
<b>Εικόνα 4.</b>	Δράση της οξειδάσης της ξανθίνης	15
<b>Εικόνα 5.</b>	Παραγωγή ROS κατά τον μεταβολισμό της αιθανόλης με τη δράση του P450	16
<b>Εικόνα 6.</b>	Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών	17
<b>Εικόνα 7.</b>	Μεταβολισμός της αίμης	27
<b>Εικόνα 8.</b>	Δράση της GCL	29
<b>Εικόνα 9.</b>	Αντιμετώπιση ελευθέρων ριζών ενδογενώς με το σύστημα της GSH	30
<b>Εικόνα 10.</b>	Δομή της γλουταθειόνης	34
<b>Εικόνα 11.</b>	Σχηματική απεικόνιση του συστήματος της γλουταθειόνης (GSH)	36
<b>Εικόνα 12.</b>	Δομή trans και cis ρεσβερατρόλης	47
<b>Εικόνα 13.</b>	Βασικά δομικά χαρακτηριστικά φλαβονοειδούς ώστε να δρα αντιοξειδωτικά	49
<b>Εικόνα 14.</b>	Εκκαθάριση ελευθέρων ριζών (R <sup>•</sup> ) από ένα φλαβονοειδές	50
<b>Εικόνα 15.</b>	Θέσεις σύνδεσης μεταβατικών μετάλλων (Mn <sup>+</sup> ) στη δομή φλαβονοειδούς	51
<b>Εικόνα 16.</b>	Προ-οξειδωτική δράση φλαβονοειδών	55
<b>Εικόνα 17.</b>	Ανατομία και σύσταση ράγας σταφυλιού	60
<b>Εικόνα 18.</b>	Βιολογικές ιδιότητες των σταφυλιών	62
<b>Εικόνα 19.</b>	Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης του οξειδωτικού παράγοντα τριτ-βούτυλ-υδροϋπεροξειδίου (t-BHP)	73
<b>Εικόνα 20.</b>	Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα	76
<b>Εικόνα 21.</b>	Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος στεμφύλων σταφυλιών στους δείκτες οξειδωτικού στρες στα Α) μυϊκά	79

C2C12 και B) τα ενδοθηλιακά EA.hy926 κύτταρα.

<b>Εικόνα 22.</b>	Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής	81
<b>Εικόνα 23.</b>	Κυτταρική βιωσιμότητα μετά την χορήγηση του εκχυλίσματος στα (A) C2C12 κύτταρα και (B) EA.hy926 κύτταρα.	90
<b>Εικόνα 24.</b>	Επίδραση της χορήγησης του εκχυλίσματος στεμφύλων για 24 ώρες στους δείκτες οξειδωτικού στρες στα κύτταρα C2C12.	92
<b>Εικόνα 25.</b>	Επίδραση της χορήγησης του εκχυλίσματος στεμφύλων για 24 ώρες στους δείκτες οξειδωτικού στρες στα κύτταρα C2C12.	93
<b>Εικόνα 26.</b>	Επίδραση της χορήγησης του εκχυλίσματος στεμφύλων για 24 ώρες στους δείκτες οξειδωτικού στρες στα κύτταρα EA.hy926	95
<b>Εικόνα 27.</b>	Επίδραση της χορήγησης του εκχυλίσματος στεμφύλων για 24 ώρες στους δείκτες οξειδωτικού στρες στα κύτταρα EA.hy926	96
<b>Εικόνα 28.</b>	Επίδραση της χορήγησης του tBHP μόνο του ή μετά την χορήγηση εκχυλίσματος στεμφύλων στους δείκτες οξειδωτικού στρες στα κύτταρα C2C12.	98
<b>Εικόνα 29.</b>	Επίδραση της χορήγησης του tBHP μόνο του ή μετά την χορήγηση εκχυλίσματος στεμφύλων στους δείκτες οξειδωτικού στρες στα κύτταρα C2C12.	99
<b>Εικόνα 30.</b>	Επίδραση της χορήγησης του tBHP μόνο του ή μετά την χορήγηση εκχυλίσματος στεμφύλων στους δείκτες οξειδωτικού στρες στα κύτταρα EA.hy926.	101
<b>Εικόνα 31.</b>	Επίδραση της χορήγησης του tBHP μόνο του ή μετά την χορήγηση εκχυλίσματος στεμφύλων στους δείκτες οξειδωτικού στρες στα κύτταρα EA.hy926.	102
<b>Εικόνα 32.</b>	Μονοπάτια μεταγωγής σήματος υπεύθυνα για την ενεργοποίηση του μονοπατιού Nrf2/ARE.	113
<b>Εικόνα 33.</b>	Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος στεμφύλων στην πρωτεϊνική έκφραση	117
<b>Εικόνα 34.</b>	Αντιπροσωπευτικά στυπώματα Western που δείχνουν τα αποτελέσματα της επίδρασης του εκχυλίσματος στεμφύλων στα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων σε μυϊκά κύτταρα C2C12.	125
<b>Εικόνα 35.</b>	Αντιπροσωπευτικά στυπώματα Western που δείχνουν τα αποτελέσματα της επίδρασης του εκχυλίσματος στεμφύλων στα επίπεδα αντιοξειδωτικών	126

ενζύμων σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926.

<b>Εικόνα 36.</b>	Επίδραση του εκχυλίσματος στεμφύλων (GPE) στην ενζυμική δραστηριότητα της (Α) S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), (Β) καταλάσης (CAT) και (C) υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) σε μυϊκά κύτταρα C2C12.	129
<b>Εικόνα 37.</b>	Επίδραση του εκχυλίσματος στεμφύλων (GPE) στην ενζυμική δραστηριότητα της (Α) S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), (Β) καταλάσης (CAT) και (C) υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926.	130
<b>Εικόνα 38.</b>	Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος	144
<b>Εικόνα 39.</b>	Χημική δομή της ένωσης 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH <sup>•</sup> ) καθώς και της ανηγμένης της μορφής 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H).	147
<b>Εικόνα 40.</b>	Χημική δομή και ενζυμική παραγωγή της ρίζας ABTS <sup>•+</sup> μέσω της δράσης της περοξειδάσης.	149
<b>Εικόνα 41.</b>	(Α) Ποσοστό δραστηριότητα σάρωσης της ρίζας 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH <sup>•</sup> ), (Β) Ποσοστό δραστηριότητα σάρωσης της ρίζας 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS <sup>•+</sup> ) και (Γ) αναγωγική δύναμη των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών από τις ποικιλίες Μαυροτράγανο, Μοσχόμαυρο και Μανδηλαριά.	161
<b>Εικόνα 42.</b>	Η βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από την χορήγηση των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών από τις ποικιλίες Μαυροτράγανο, Μοσχόμαυρο και Μανδηλαριά. (Α-Γ) στα EA.hy926 κύτταρα και (D-F) στα C2C12 κύτταρα.	163
<b>Εικόνα 43.</b>	Επίδραση της χορήγησης των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών για 24 h στα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες στα κύτταρα C2C12.	166
<b>Εικόνα 44.</b>	Επίδραση της χορήγησης των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών για 24 h στα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες στα κύτταρα EA.hy926.	168

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1.</b>	Κατηγορίες φλαβονοειδών	44
<b>Πίνακας 2.</b>	Χημική δομή πολυφαινολικών οξέων	46
<b>Πίνακας 3.</b>	Πολυφαινολική σύσταση του εκχυλίσματος στεμφύλων όπως προσδιορίστηκε με τη χρήση της μεθόδου LC-HRMS.	89
<b>Πίνακας 4.</b>	Πολυφαινολικό περιεχόμενο των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών. <sup>a</sup> Όλες οι τιμές εκφράζονται ως mg/g ξηρού εκχυλίσματος.	158
<b>Πίνακας 5.</b>	Δραστικότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών έναντι των ριζών DPPH <sup>•</sup> και ABTS <sup>•+</sup> καθώς επίσης και η αναγωγική ισχύς των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών.	160
<b>Πίνακας 6.</b>	Αποτελέσματα ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης του RNA με τη χρήση του NanoPhotometer Implen P330.	181
<b>Πίνακας 7.</b>	Γονίδια που υπερεκφράστηκαν και υποεκφράστηκαν στις 15 ώρες επώασης με το εκχύλισμα στεμφύλων και διαφορά στην έκφρασή τους.	185
<b>Πίνακας 8.</b>	Αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης σε αντιοξειδωτικά γονίδια.	186

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

<b>ROS</b>	(Reactive Oxygen Species)	Δραστικές μορφές οξυγόνου
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	(Superoxide radicals)	Ρίζες σουπεροξειδικού ανιόντος
<b>OH<sup>•</sup></b>	(Hydroxyl radicals)	Ρίζες υδροξυλίου
<b>RO<sup>•</sup></b>	(Alkoxyl radicals)	Ρίζες αλκοξυλίου
<b>HO<sub>2</sub><sup>•</sup></b>	(Hydroperoxyl radicals)	Ρίζες υδρουπεροξυλίου
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	(Hydrogen peroxide)	Υπεροξείδιο του υδρογόνου
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	(Singlet oxygen)	Μονήρες οξυγόνο
<b>CoQ</b>	(Coenzyme Q)	Συνένζυμο Q
<b>SOD</b>	(Superoxide dismutase)	Υπεροξειδική δισμουτάση
<b>CAT</b>	(Catalase)	Καταλάση
<b>GPx</b>	(Glutathione peroxidase)	Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης
<b>GR</b>	(Glutathione reductase)	Αναγωγάση της γλουταθειόνης
<b>GSH</b>	(reduced form of glutathione)	ανηγμένη γλουταθειόνη
<b>GSSG</b>	(oxidized form of glutathione)	οξειδωμένη γλουταθειόνη
<b>O<sub>3</sub></b>	(Ozone)	Όζον
<b>MDA</b>	(Malondialdehyde)	Μαλονδιαλδεΐδη
<b>TBARS</b>	(Thiobarbituric Reactive Substances)	Ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ
<b>DPPH</b>	(1,1-didhenyl-2 picrhydrazyl)	1,1 διφαινυλ-2-πικριδραζύλιο
<b>EDTA</b>	(Ethylenediaminetetraacetic acid)	Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ
<b>TCA</b>	(Trichloroacetic acid)	Τριχλωροοξικό οξύ
<b>DNPH</b>	(2,4-dinitrophenylhydrazine)	2,4-δινιτροφαινυλυδραζίνη
<b>ABTS</b>	(2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline)-6-sulphonic acid)	2,2-αζινοδις-(3-αιθυλβενζοθειαζολίνη)-6- σουλφονικό οξύ
<b>tBHP</b>	(Tert-butyl-hydroperoxide)	Τριτ-βούτυλο-υδροϋπεροξείδιο
<b>DMEM</b>	(Dulbecco's modified Eagle's medium)	
<b>PBS</b>	(phosphate buffered saline)	ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

# ***ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1***

## ***ΕΙΣΑΓΩΓΗ***

## 1. Ελεύθερες ρίζες

Ως ελεύθερη ρίζα ορίζεται ένα μόριο ή άτομο που περιέχει ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια στην εξωτερική στιβάδα σθένους (Halliwell & Gutteridge, 1989; Jenkins et al., 1988; Mylonas & Kouretas, 1999) και μπορεί να προκύψει είτε με την προσθήκη είτε με την απώλεια ενός ηλεκτρονίου από την εξωτερική ηλεκτρονιακή του στιβάδα (Mylonas & Kouretas, 1999). Ασύζευκτο ηλεκτρόνιο ονομάζεται αυτό που καταλαμβάνει μόνο του ένα ατομικό ή μοριακό τροχιακό και παριστάνεται συνήθως με μία τελεία πάνω και δεξιά ή αριστερά από το χημικό τύπο της ελεύθερης ρίζας. Πρόκειται για ιδιαίτερα ασταθή μόρια που έχουν την τάση να αντιδρούν εύκολα με άλλα μόρια οξειδώνοντάς τα. Παράλληλα οι ελεύθερες ρίζες ανάγονται σε μια πιο σταθερή δομή. Η αντίδραση αυτή γίνεται με σκοπό να συμπληρωθεί η εξωτερική στιβάδα των ελευθέρων ριζών. Η παραγωγή των ελευθέρων ριζών μπορεί να πραγματοποιηθεί υπό φυσιολογικές βιολογικές διαδικασίες που πραγματοποιούνται εντός των κυττάρων ενός οργανισμού αλλά και όταν ο οργανισμός εκτίθεται σε συγκεκριμένης τοξικότητας περιβάλλον. Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικά μόρια και μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε διάφορα βιολογικά μακρομόρια με αποτέλεσμα να επηρεάσουν διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες του κυττάρου και κατ' επέκταση του οργανισμού.

Ο σχηματισμός των ελευθέρων ριζών πραγματοποιείται με δύο μηχανισμούς: Ο πρώτος είναι η διάσπαση ενός ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ δύο ατόμων. Δηλαδή, ένας ομοιοπολικός δεσμός θα διασπαστεί και το ζεύγος ηλεκτρονίων είτε θα παραμείνει στο αρχικό μόριο και θα σχηματιστούν δύο ιόντα, είτε θα διαχωριστεί και θα δημιουργηθούν δύο ρίζες. Ο δεύτερος μηχανισμός παραγωγής ελευθέρων ριζών

πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων, που είναι και ο πιο σύνηθες τρόπος στα βιολογικά συστήματα.

Ο μηχανισμός δράσης ελευθέρων ριζών αποτελείται από τρία στάδια, την έναρξη, τη διάδοση και το τερματισμό. Στη διάδοση κάθε σχηματιζόμενη ρίζα μπορεί να αντιδράσει με ένα ουδέτερο μόριο και να δώσει μια νέα ρίζα. Η νέα αυτή ρίζα θα αντιδράσει με τη σειρά της με άλλο μόριο και έτσι να προαχθεί η διάδοση παραγωγής ελευθέρων ριζών. Η αντίδραση θα σταματήσει όταν όλες οι ελεύθερες ρίζες αντιδράσουν προς προϊόντα που δεν παρέχουν νέες ελεύθερες ρίζες.

**Έναρξη**      ενέργεια       $R^\bullet$  (ελεύθερη ρίζα)

**Διάδοση**       $\longrightarrow$        $R^\bullet + O_2 \longrightarrow ROO^\bullet + ROOH$  (ρίζα υπεροξειδίου)

$ROO^\bullet + RH \longrightarrow R^\bullet + ROOH$

**Τερματισμός**

$R^\bullet + R^\bullet \longrightarrow R-R$

(αδρανή προϊόντα που δε προκαλούν έναρξη ή διάδοση)

$ROO^\bullet + R \longrightarrow ROOR$

$ROO^\bullet + ROO^\bullet \longrightarrow ROOH + O_2$

Η έναρξη της αντίδρασης οφείλεται στο σχηματισμό των πρώτων ελευθέρων ριζών παρουσία ενέργειας, δηλαδή μορίων με ένα μονήρες ηλεκτρόνιο στην εξωτερική τους ηλεκτρονιακή στιβάδα. Τα κυριότερα από τα αρχικά προϊόντα της αυτοοξειδωσης είναι τα υδροξυ-υπεροξειδία. Αυτά στη συνέχεια δίνουν νέες ρίζες υπεροξειδίων, άλλα υδροξυ-υπεροξειδία και νέες ρίζες από το υδρογονανθρακικό τμήμα του μορίου. Τα νέα προϊόντα συμβάλλουν με τη σειρά τους στην αλυσιδωτή αντίδραση που συνεχίζεται με ταχύτατο ρυθμό (Μπόσκου, 1997).

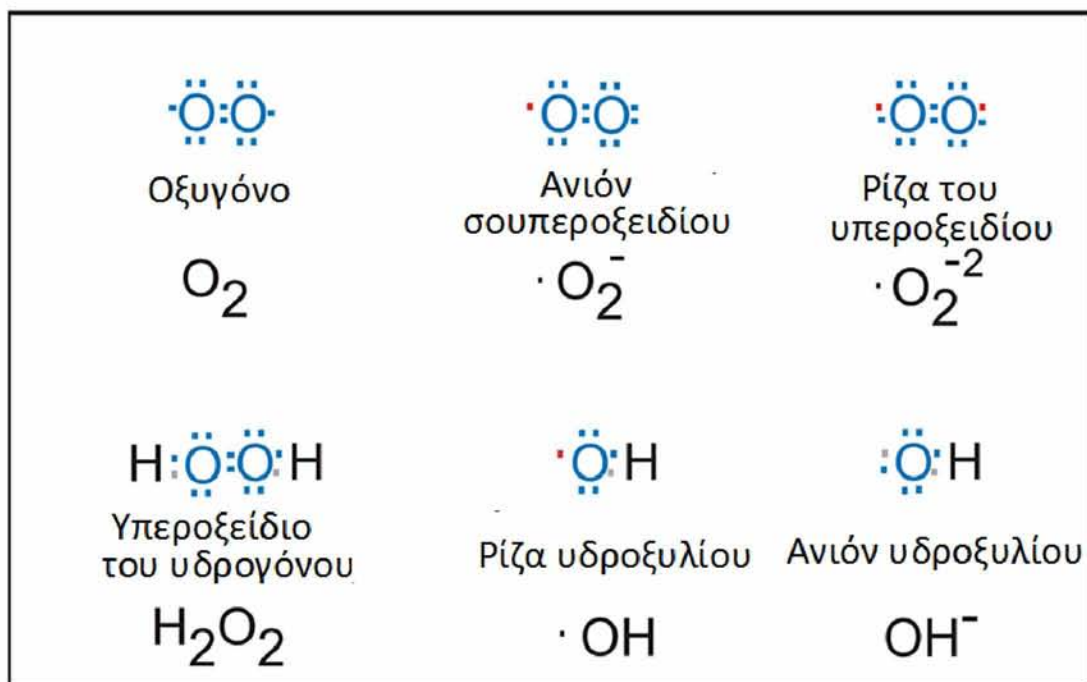


### 1.1. Δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS)

Οι πιο σημαντικές ελεύθερες ρίζες που παράγονται σε έναν ζωντανό οργανισμό είναι η ρίζα του υδροξυλίου ( $\text{OH}^\bullet$ ), του σουπεροξειδίου ( $\text{O}_2^\bullet$ ), του μονοξειδίου του αζώτου ( $\text{NO}^\bullet$ ), του αλκοξυλίου ( $\text{RO}^\bullet$ ), του υπεροξειδίου ( $\text{ROO}^\bullet$ ), του τριχλωρομεθυλίου ( $\text{CCl}_3^\bullet$ ) και οιθειούχες ρίζες ( $\text{RS}^\bullet$ ). Από αυτές, παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Ο όρος δραστικές μορφές οξυγόνου αναφέρεται σε ενώσεις, που παράγονται από το μοριακό οξυγόνο με αναγωγή ενός, δύο ή τριών ηλεκτρονίων, καθώς και σε ρίζες οξυγόνου ή οργανικές ρίζες και υπεροξείδια, που παράγονται από ενώσεις, που έχουν αντιδράσει με ρίζες οξυγόνου (Cheeseman et al., 1993). Στις ROS επίσης περιλαμβάνονται και παράγωγα του οξυγόνου που δεν είναι ρίζες (non-radicals), όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) και το υποχλωριώδες οξύ ( $\text{COCl}$ ), αλλά μπορούν να προκαλέσουν την παραγωγή ελευθέρων ριζών (Halliwell, 2001; Halliwell and Gutteridge, 1990; Fang et al., 2002).

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (Reactive Oxygen Species, ROS) ταξινομούνται στις εξής τέσσερις κατηγορίες: 1. Ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα υδροξυλίου ( $\text{OH}^\bullet$ ) 2. Ιόντα, όπως το υποχλωριώδες ανιόν ( $\text{ClO}^-$ ), που προκύπτει από τη διάσπαση του υποχλωριώδους οξέος ( $\text{HClO}$ ) 3. Συνδυασμούς ελευθέρων ριζών και ιόντων όπως το ανιόν σουπεροξειδίου ( $\text{O}_2^\bullet$ ) και 4. Μόρια όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Halliwell, 2001). Εκτός από τις δραστικές μορφές οξυγόνου που προέρχονται από το οξυγόνο, στις ελεύθερες ρίζες συγκαταλέγονται οι δραστικές μορφές αζώτου (RNS) που προέρχονται από το άζωτο, οι δραστικές μορφές θείου (RSS) που προέρχονται από το θείο και οι δραστικές μορφές χλωρίου (RCS) που προέρχονται από το χλώριο. Αυτές οι κατηγορίες ριζών μπορούν να προέλθουν από

αντίδραση με τις ROS ή να αυξήσουν την παραγωγή των ROS (Giles and Jacob, 2002).

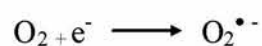


Εικόνα 1. Δραστικές Μορφές Οξυγόνου

### 1.1.1. Ελεύθερες ρίζες οξυγόνου

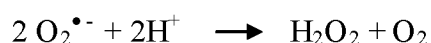
#### Σουπεροξείδιο ή ανιόν του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet -}$ )

Το σουπεροξείδιο ( $O_2^{\bullet -}$ ) σχηματίζεται από την αναγωγή του οξυγόνου από ένα  $e^-$  σύμφωνα με την ακόλουθη αντίδραση:



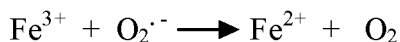
Το σουπεροξειδίο έχει παραμαγνητικές ιδιότητες λόγω του ασύζευκτου ηλεκτρονίου. Ο σχηματισμός του σουπεροξειδίου πραγματοποιείται αυθόρμητα υπό αερόβιες συνθήκες στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων κατά τη διάρκεια της λειτουργίας «της αναπνευστικής αλυσίδας». Μέσω ενζυμικών αντιδράσεων μπορεί να παραχθεί σουπεροξειδίο. Ένζυμα που καταλύουν την παραγωγή σουπεροξειδίου είναι η λιποξυγενάση, η κυκλοξυγενάση και η NADPH-οξειδάση των φαγοκυττάρων που αποτελεί ένα παράδειγμα σκόπιμης παραγωγής  $O_2^{\bullet -}$ . Η ρίζα του σουπεροξειδίου παίζει κεντρικό ρόλο στη βιοχημεία των ελευθέρων ριζών επειδή από τη ρίζα αυτή παράγονται πολλές άλλες δραστικές μορφές οξυγόνου. Το  $O_2^{\bullet -}$ , όπως και όλες οι ρίζες, είναι ένα ηλεκτρονικά ανεπαρκές είδος που τείνει να σταθεροποιηθεί μέσω σύζευξης με άλλη ρίζα ή πρόσληψης ηλεκτρονίου. Αυτό μπορεί να γίνει και αν αντιδράσουν δύο ρίζες  $O_2^{\bullet -}$  μεταξύ τους (Παπαγεωργίου, 2005).

Σε υδατικά διαλύματα με ουδέτερο pH δύο ρίζες  $O_2^{\bullet -}$  αντιδρούν μεταξύ τους και σχηματίζουν υπεροξειδίο του υδρογόνου, σύμφωνα με την αντίδραση:



#### Υπεροξειδική ρίζα ( $OH^{\bullet}$ )

Η υπεροξειδική ρίζα  $OH^{\bullet}$  είναι πολύ δραστική, όπως έχει αποδειχθεί σε πολλές μελέτες (Bielski and Cabelli, 1995; Halliwell and Gutteridge, 1999; Von Sonntag, 1987). Αυτή προκύπτει σύμφωνα με την αντίδραση Fenton-Haber-Weiss μεταξύ του ανιόντος του σουπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet -}$ ) και του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) παρουσία ενός μετάλλου μετάπτωσης, το οποίο επιταχύνει την αντίδραση. Στα βιολογικά συστήματα το μέταλλο αυτό είναι συνήθως ο σίδηρος (Mylonas and Kouretas, 1999). Η αντίδραση καταλύεται ως εξής:



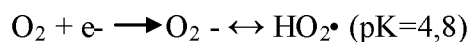
Ο χαλκός και άλλα μεταλλικά ιόντα μπορούν επίσης να συμμετέχουν στην αντίδραση. Η ρίζα υδροξυλίου είναι ένας ισχυρός οξειδωτικός παράγοντας που αντιδρά με πολλά οργανικά και ανόργανα μόρια στο κύτταρο (DNA, πρωτεΐνες, λιπίδια, αμινοξέα και μέταλλα) και μπορεί να προκαλέσει οξειδωτική βλάβη (Halliwell and Gutteridge, 1999).

#### Υπεροξειδικές ρίζες (ROO<sup>-</sup>)

Οι υπεροξειδικές ρίζες ROO<sup>-</sup> σχηματίζονται από την προσθήκη μοριακού οξυγόνου (O<sub>2</sub>) σε ελεύθερες οργανικές ρίζες. Είναι τοξικές για τα κύτταρα επειδή μπορούν να αφαιρέσουν άτομα υδρογόνου από τα λιπίδια και με αυτό τον τρόπο να προωθήσουν τη λιπιδική υπεροξείδωση (Παπαγεωργίου, 2005).

#### Ρίζα Υδροϋπεροξειδίου (HO<sub>2</sub><sup>·</sup>)

Η ρίζα υδροϋπεροξειδίου HO<sub>2</sub><sup>·</sup> προκύπτει από αναγωγή 1 e<sup>-</sup> στο οξυγόνο, σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



### 1.1.2. Μη ρίζες του οξυγόνου

#### Υπεροξειδίο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ )

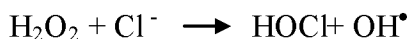
Το υπεροξειδίο του υδρογόνου  $H_2O_2$  παράγεται με αναγωγή του οξυγόνου με δύο ηλεκτρόνια, σύμφωνα με την αντίδραση:



Στο μόριο του  $H_2O_2$  δεν περιέχει ασύζευκτο ηλεκτρόνιο γι' αυτό και δεν είναι ελεύθερη ρίζα. Υπό συγκεκριμένες συνθήκες (όπως είναι η παρουσία μεταλλικών ιόντων), διασπάται και σχηματίζει υδροξυλική ρίζα ( $HO^\bullet$ ), που είναι ιδιαίτερος δραστική και τοξική για τα κύτταρα. Η τοξικότητα του  $H_2O_2$  στα κύτταρα διαφέρει, γεγονός που οφείλεται στην ικανότητα που έχουν τα διάφορα κύτταρα να απομακρύνουν το  $H_2O_2$ . Εκτός αυτού υπάρχουν τρία αντιοξειδωτικά συστήματα, τα οποία ενεργοποιούνται για να απομακρύνουν τα μόρια  $H_2O_2$ , μόλις αυτά παραχθούν (Παπαγεωργίου, 2005).

#### Υποχλωριώδες οξύ ( $HOCl$ )

Το υποχλωριώδες οξύ ( $HOCl$ ) είναι πολύ πιο τοξικό από το  $H_2O_2$  και το  $O_2^{\cdot-}$  και σχηματίζεται με την ενεργοποίηση των ουδετερόφιλων κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Όταν ενεργοποιηθούν τα ουδετερόφιλα, η μυελο-υπεροξειδάση (ένζυμο που βρίσκεται στο κυτόπλάσμα των φαγοκυττάρων), καταλύει την αντίδραση του υπεροξειδίου του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) με το χλώριο ( $Cl^-$ ), σύμφωνα με την παρακάτω αντίδραση:



Το υποχλωριώδες οξύ είναι ασθενές, εν τούτοις πολύ δραστικό χημικά. Ενοχοποιείται ότι οδηγεί σε κυτταρική νέκρωση μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα. Καταστρέφει τα αποθέματα ATP που βρίσκονται στα μιτοχόνδρια, δυσχεραίνει το μηχανισμό παραγωγής ενέργειας του κυττάρου, προκαλείται «οίδημα» σ' αυτά, απώλεια δυναμικού κυτταρικής μεμβράνης και απελευθέρωση κυτοχρώματος C, οπότε επέρχεται η κυτταρική απόπτωση. Εκτός αυτών, η έκθεση των βιομορίων (λιπίδια, DNA, πρωτεΐνες) καθώς και μικρότερων μορίων (ασκορβικό οξύ, νουκλεοτίδια) στο υποχλωριώδες οξύ είναι συνυφασμένη με πρόκληση οξειδωτικών βλαβών (Whiteman et al., 2005).

#### Όζον ( $O_3$ )

Το όζον  $O_3$  βρίσκεται στα ανώτερα στρώματα της ατμόσφαιρας και έχει μεγάλη βιολογική σημασία επειδή απορροφά τις βλαβερές για τους ζωντανούς οργανισμούς, υπεριώδεις ακτινοβολίες. Σχηματίζεται με φωτοδιάσπαση του  $O_2$  από την υπεριώδη ακτινοβολία σε ατομικό οξυγόνο το οποίο εν συνεχεία αντιδρά με μοριακό οξυγόνο. Το όζον δεν είναι ελεύθερη ρίζα. Πρόκειται για οξειδωτικό αέριο στο μόριο του οποίου περιέχονται τρία άτομα οξυγόνου. Είναι διαμαγνητικό, έχει χαρακτηριστική οσμή και ιδιαίτερα περιορισμένη διαλυτότητα στο νερό (Παπαγεωργίου, 2005).

#### Μονήρες οξυγόνο ( $^1O_2$ )

Το μονήρες οξυγόνο  $^1O_2$  (singlet oxygen) έχει όλα τα ηλεκτρόνια του συζευγμένα, πράγμα που σημαίνει ότι ουσιαστικά δεν είναι ελεύθερη ρίζα. Το  $^1O_2$  σχηματίζεται μέσω μιας αλλαγής στην κατάσταση του spin, από παράλληλη σε

αντιπαράλληλη. Αυτό αυξάνει πάρα πολύ τη δραστικότητα του, περισσότερο από το μοριακό οξυγόνο, επειδή αναιρείται ο περιορισμός του spin και παρουσιάζει αυξημένη οξειδωτική ικανότητα. Αυτό συμβαίνει επειδή το μονήρες οξυγόνο βρίσκεται σε διεγερμένη κατάσταση. Έχει μικρή διάρκεια ημιζωής και τη δυνατότητα να διαπερνά τα κύτταρα (Halliwell, 1995).

Αποτελεί το μεγαλύτερο καταλύτη για την έναρξη της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, η οποία οδηγεί σε καταστροφή των μεμβρανών. Το  $^1\text{O}_2$  σχηματίζεται κατά την άμεση μεταφορά ενέργειας από φωτοευαίσθητα μόρια.

## **1.2. Πηγές Παραγωγής Δραστικών Μορφών Οξυγόνου**

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου παράγονται μέσα από διάφορες εσωτερικές φυσιολογικές λειτουργίες του οργανισμού καθώς αποτελούν προϊόντα της φυσιολογικής λειτουργίας του μεταβολισμού του κυττάρου (ενδοκυτταρικές πηγές). Επίσης παράγονται και όταν το σώμα εκτίθεται σε συγκεκριμένης τοξικότητας περιβάλλον (εξωκυτταρικές πηγές). Οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικά μόρια και μπορούν να προκαλέσουν βλάβες σε διάφορα βιολογικά μακρομόρια και κατά συνέπεια σε κυτταρικές λειτουργίες. Μάλιστα, εκτός από τις επιβλαβείς συνέπειες που έχουν για το κύτταρο, έχουν σημαντική λειτουργία και στην μεταγωγή σήματος, τόσο ενδοκυτταρικά, όσο και διακυτταρικά.

Σε γενικές γραμμές, δραστικές μορφές οξυγόνου παράγονται κατά:

- τις αντιδράσεις της αναπνευστικής αλυσίδας,
- προοξειδωτικά ενζυμικά συστήματα,
- τη λιπιδική οξείδωση,
- την ακτινοβολία,

- τη φλεγμονή,
- το κάπνισμα
- την ατμοσφαιρική ρύπανση

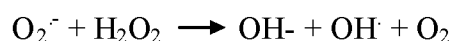
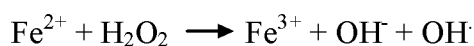
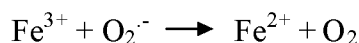
### 1.2.1. Ενδοκυτταρικές πηγές

#### Οξειδωτική φωσφορυλίωση

Είναι μία διαδικασία, η οποία λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και θεωρείται ίσως η σημαντικότερη ενδοκυτταρική πηγή ROS. Η πλειοψηφία των ROS παράγεται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια αφού το 0,1-1% του οξυγόνου μετατρέπεται σε ρίζα.

Η αφυδρογονάση του NADH (σύμπλεγμα 1) και το σύμπλεγμα κυτοχρώματος bc1 (σύμπλεγμα 3), είναι γνωστές θέσεις παραγωγής  $O_2^{\cdot-}$  και  $H_2O_2$  (Chance et al., 1979). Το  $H_2O_2$  δημιουργείται με τη μεταφορά από το NADH και  $FADH_2$  στην ουβικινόνη. Η ροή ηλεκτρονίων στο μοριακό οξυγόνο παράγει  $O_2^{\cdot-}$  (Chance et al., 1979). Το  $O_2^{\cdot-}$  ανάγεται σε  $H_2O_2$  από τη μιτοχονδριακή δισμουτάση του υπεροξειδίου (Mn-SOD). Ακόμα, μέσω της αντίδρασης Haber-Weiss ανάμεσα στο  $O_2^{\cdot-}$  και στο  $H_2O_2$  δημιουργείται  $OH^{\cdot}$ .

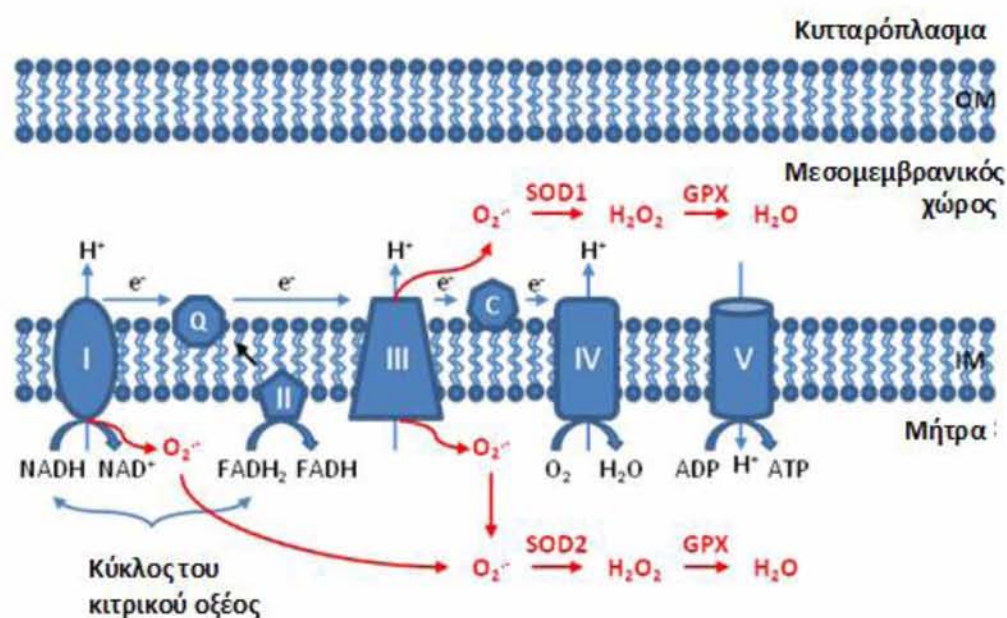
Αντίδραση Haber-Weiss:





Στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου παράγεται επίσης μονοξείδιο του αζώτου (NO) από τη συνθάση του NO. Το μονοξείδιο του αζώτου αντιδρά με το ανιόν σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) και παράγει υπεροξυνιτρικό ανιόν ( $ONOO^-$ ), το οποίο σε φυσιολογικό pH παράγει υπεροξυνιτρώδες οξύ ( $ONOOH$ ) (Korpenol, 1998). Από αυτό τελικά σχηματίζονται οι ρίζες  $OH^{\cdot}$  και  $NO_2^{\cdot}$ .

Η αντίδραση του μονοξειδίου του αζώτου (NO) με την ουβικινόλη ( $UQH_2$ ) οδηγεί στο σχηματισμό ημικινόνης ( $UQH$ ), η οποία λειτουργεί σαν σημείο παραγωγής σουπεροξειδίου ( $O_2^{\cdot-}$ ) (Cadenas, 1997).



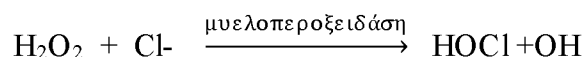
Εικόνα 2. Παραγωγή ελευθέρων ριζών κατά την αναπνευστική αλυσίδα.

### Ουδετερόφιλα και αναπνευστική «έκρηξη»

Τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (PMN) είναι κύτταρα του ανοσοποιητικού που παίζουν σημαντικό ρόλο στην προστασία των ιστών από την προσβολή τους από ιούς και βακτήρια (Pyne, 1994; Slauch, 2011). Η ενεργοποίηση των PMN τυπικά αρχίζει με την καταστροφή του ιστού που προκαλείται από ROS ή

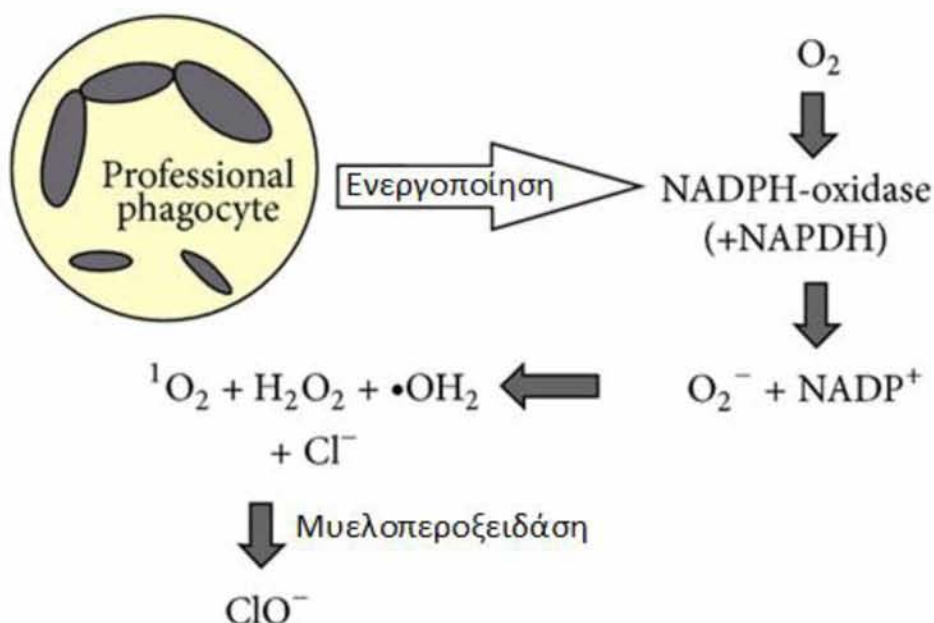
άλλους μηχανισμούς (Meydani et al, 1992). Στην οξεία φάση αντίδρασης, τα PMN μεταναστεύουν στην περιοχή τραυματισμού καθώς προσελκύονται από χημειοτακτικούς παράγοντες που προέρχονται από τα κατεστραμμένα κύτταρα και απελευθερώνουν τα λυτικά ένζυμα καθώς και το  $O_2^{\cdot-}$  κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης. Τα λυτικά ένζυμα διευκολύνουν την καταστροφή των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβες ενώ το  $O_2^{\cdot-}$  παράγεται από τη μυελοϋπεροξειδάση και την NADPH οξειδάση (Petrone et al., 1980; Slauch, 2011; Forman and Torres, 2002).

Η κυτταροπλασματική δισμουτάση του υπεροξειδίου μετατρέπει το  $O_2^{\cdot-}$  σε  $H_2O_2$ , το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε  $OH^{\cdot}$  από ιόντα μετάλλων ή σε  $HOCl$ :



Αυτή η φλεγμονώδης αντίδραση θεωρείται σημαντική για την απομάκρυνση κατεστραμμένων πρωτεϊνών και την παρεμπόδιση βακτηριακής και ιικής μόλυνσης. Ωστόσο, ROS και άλλα οξειδωτικά μόρια που απελευθερώνονται από τα ουδετερόφιλα μπορούν να προκαλέσουν δευτερογενή βλάβη όπως υπεροξείδωση των λιπιδίων (Meydani et al., 1992; Forman and Torres, 2002).

Η φαγοκυττάρωση βακτηρίων ή ιών, προκαλεί το φαινόμενο που είναι γνωστό και ως αναπνευστική «έκρηξη». Χαρακτηρίζεται από αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου και γλυκόζης από τα κύτταρα και έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή σουπεροξειδίου και εν τέλει  $HOCl$  όπως αναφέρθηκε.

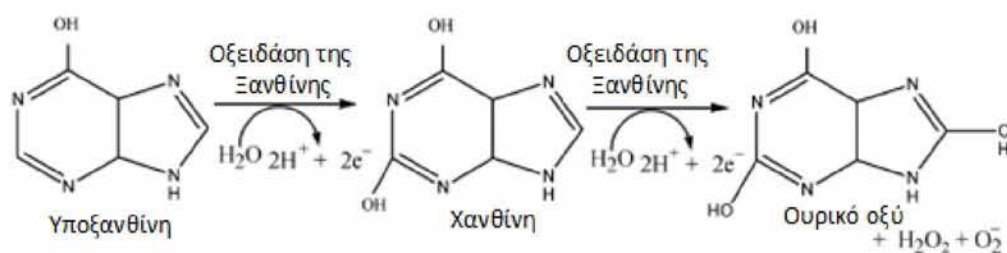


Εικόνα 3. Η οξειδωτική έκρηξη κατά τη φλεγμονή

#### Μετατροπή της ξανθίνης σε ουρικό οξύ

Οι αντιδράσεις που καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης αποτελούν σημαντική πηγή παραγωγής ελευθέρων ριζών (Downey, 1990; Kuprasamy and Zweier, 1989). Κατά τη διάρκεια της ισχαιμίας το ATP αποφωσφορυλιώνεται σε ADP και AMP εξαιτίας της ενέργειας που απαιτείται λόγω της σύσπασης του μυοκαρδίου. Αν τα αποθέματα οξυγόνου είναι ανεπαρκή το AMP μετατρέπεται σε υποξανθίνη, ξανθίνη και τελικά σε ουρικό οξύ.

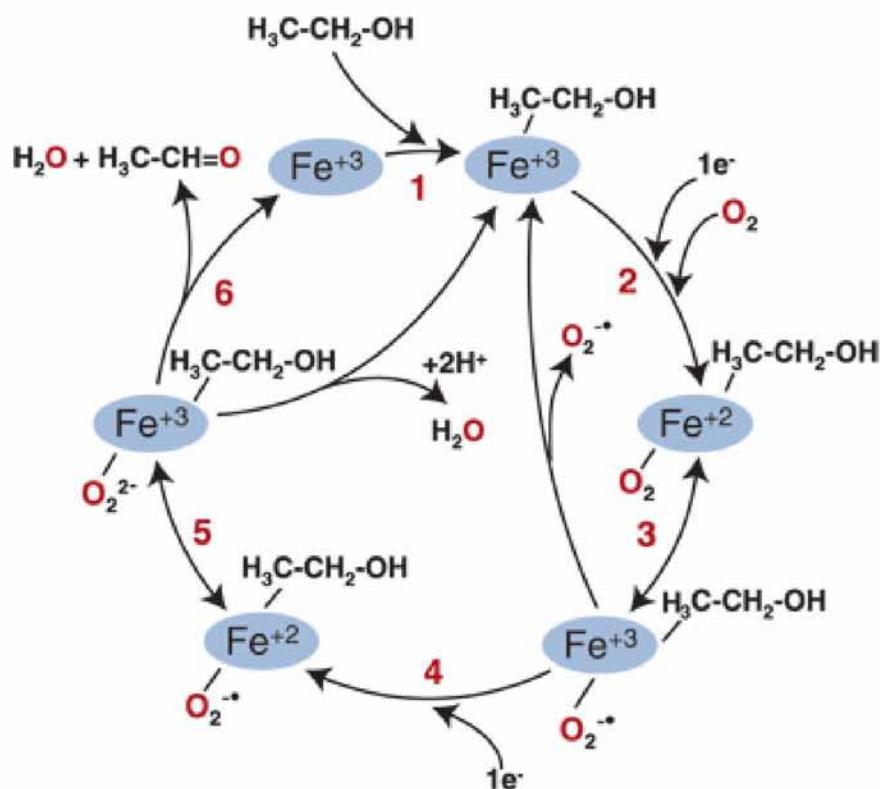
Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την οξειδάση της ξανθίνης και συνοδεύεται από σχηματισμό του  $O_2^-$ . Η οξειδάση της ξανθίνης πρέπει να μετατραπεί από την ανηγμένη στην οξειδωμένη της μορφή από μία ενδοκυτταρική πρωτεάση που ενεργοποιείται από το  $Ca^{2+}$  ενώ το μοριακό οξυγόνο είναι δέκτης ηλεκτρονίων.



Εικόνα 4. Δράση της οξειδάσης της ξανθίνης

#### Κυτόχρωμα P450

Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες τα μικροσώματα των ηπατικών κυττάρων παράγουν ROS μέσω του κυτοχρώματος P450 (Yu, 1994). Το NADPH υφίσταται οξείδωση δημιουργώντας  $\text{O}_2^{\cdot-}$  το οποίο στη συνέχεια μπορεί να μετατραπεί σε  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Chance et al., 1979). Ο ρυθμός παραγωγής του  $\text{H}_2\text{O}_2$  είναι ανάλογος με την κατανάλωση οξυγόνου στο μικρόσωμα (Halliwell and Gutteridge, 1989). Παρουσία ADP και  $\text{Fe}^{3+}$  η NADPH οξείδωση καταλύει τη μεταφορά ενός ηλεκτρονίου από το NADPH στο  $\text{O}_2$  παράγοντας  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .

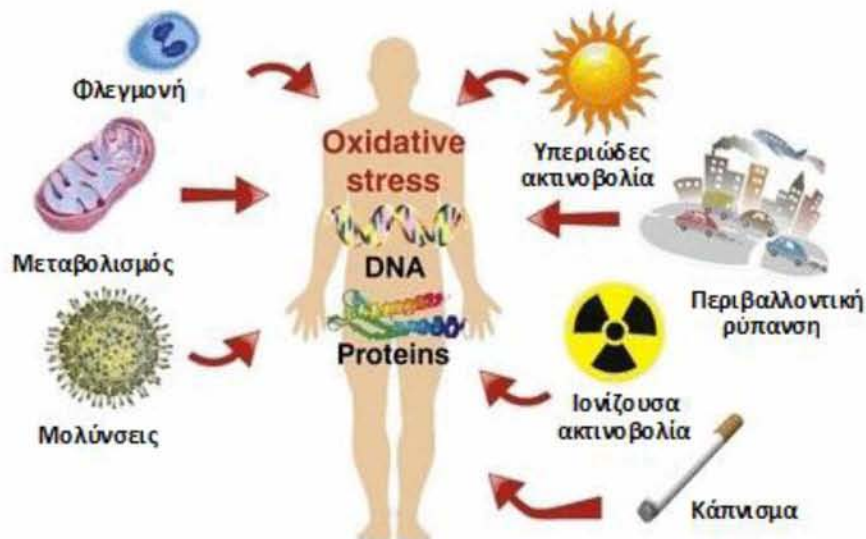


Εικόνα 5. Παραγωγή ROS κατά τον μεταβολισμό της αιθανόλης με τη δράση του P450.

### 1.2.2. Εξωκυτταρικές πηγές

Η ηλιακή και ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, η ατμοσφαιρική ρύπανση, ο καπνός του τσιγάρου και τα βιομηχανικά απόβλητα είναι σημαντικοί οξειδωτικοί παράγοντες (Koren, 1995; Victoria, 1994). Επίσης, ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν από τη δράση ορισμένων φαρμάκων (Naito et al., 1998; Rav et al., 2001) και άλλων ξενοβιοτικών όπως τοξίνες και εντομοκτόνα καθώς ακόμα και από το αλκοόλ (Elsayed et al., 1992; Jones et al., 2000; Obata et al., 2001; Wormser et al., 2000). Τέλος, σημαντική πηγή οξειδωτικών είναι και η διατροφή (Ames, 1986; Kanner and Labidot, 2001; Lijinsky, 1999).





Εικόνα 6. Πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών

### 1.3. Βιολογική δράση των ROS

#### Θετικές επιδράσεις

Οι ελεύθερες ρίζες συμμετέχουν σε αρκετά σηματοδοτικά μονοπάτια, τόσο ενδοκυτταρικά όσο και διακυτταρικά (Sen et al., 1996; Rimbach et al., 1999; Reid, 2001; Sen, 2001; Linnane et al., 2002). Για παράδειγμα, έχουν τη δυνατότητα τροποποίησης της δραστηριότητας πρωτεϊνών προκαλώντας το σχηματισμό δισουλφιδικών δεσμών. Οι πρωτεΐνες στόχοι των ROS ανήκουν σε πολλές κατηγορίες όπως φωσφατάσες, MAP κινάσες, μεταγραφικοί παράγοντες και απακετυλάσες ή μεθυλάσες ιστονών.

Επίσης, οι ROS έχουν καίριο ρόλο σε ορισμένους μηχανισμούς του ανοσοποιητικού συστήματος, δρώντας ενάντια στα αντιγόνα κατά τη διάρκεια της φαγοκυττάρωσης. Ο ρόλος τους αυτός ενισχύεται κατά τη διάρκεια της φλεγμονής

(Finaud et al., 2006). Επιπλέον ρυθμίζουν μηχανισμούς που συνδέονται με την ανοσία, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, το μεταβολισμό, την απόπτωση και τη μυϊκή συστολή (Reid, 2001; Linnane et al., 2002). Η αναστολή της παραγωγής ROS οδηγεί σε απώλεια της μυϊκής συστολής ενώ αυξημένη παραγωγή ROS έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης. Ακόμα, αιμοπετάλια που βρίσκονται σε περιοχή που έχει υποστεί πληγή απελευθερώνουν ROS τα οποία αποτελούν σήμα για την στρατολόγηση κι άλλων αιμοπεταλίων στην περιοχή καθώς και λευκοκυττάρων. Τέλος, συμμετέχουν και στη διαδικασία της αγγειογένεσης.

#### Αρνητικές επιδράσεις

Η υπερβολική παραγωγή ελευθέρων ριζών εμπλέκεται στη δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Halliwell & Gutteridge, 1998), τη μυϊκή καταστροφή (Nikolaidis et al., 2008) και την κόπωση (Betters et al., 2004). Προηγούμενες μελέτες έχουν αναφέρει ότι το 2%-5% του μοριακού οξυγόνου ( $O_2$ ) που χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης στα μιτοχόνδρια σκελετικών μυών οδηγεί στην παραγωγή ανιόντος σουπεροξειδίου στην ηρεμία (Sjodin et al., 1990). Εντούτοις, πιο πρόσφατα έχειδειχτεί ότι η διαρροή ελευθέρων ριζών στα μιτοχόνδρια του καρδιακού μυός κυμαίνεται από 0,4% ως 0,8% (Hansford et al., 1997) ή ακόμα και σε 0,15% στο σκελετικό μυ (St-Pierre et al., 2002). Επιπλέον, όταν τα μιτοχόνδρια εργάζονται έντονα για την παραγωγή ATP από το ADP, όπως συμβαίνει κατά τη διάρκεια της άσκησης, το ποσό οξυγόνου που μετατρέπεται σε ελεύθερες ρίζες μειώνεται περίπου στο ένα δέκατο του ποσοστού που παρατηρείται κατά την ηρεμία (Vina et al., 2000). Οι ελεύθερες ρίζες, επίσης, οξειδώνουν διάφορα βιομόρια όπως τα λιπίδια των μεμβρανών, τις πρωτεΐνες και το DNA. Έχουν ακόμα συσχετιστεί και με

διάφορες ασθένειες όπως του Parkinson, του Alzheimer, την κατάθλιψη και τη γήρανση (Halliwell & Gutteridge, 1998).

### *Λιπίδια*

Όσον αφορά τα λιπίδια, είναι ευαίσθητα σε οξείδωση. Καθώς όλες οι μεμβράνες, κυτταρικές και κυτταρικών οργανιδίων, αποτελούνται από λιπίδια μπορούν να υποστούν βλάβες από τις ελεύθερες ρίζες. Εδώ κυρίως προσβάλλονται τα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) ως δομικά συστατικά των μεμβρανών του κυττάρου. Η οξείδωση των PUFA είναι η εναρκτήρια αντίδραση της λιπιδικής υπεροξείδωσης, η οποία οδηγεί στην παραγωγή ριζών περοξυλίου  $\text{ROO}^\bullet$ , συζυγών διενίων και μηλονικής διαλδεΰδης (MDA). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ρευστότητας και της διαπερατότητάς τους. Επίσης, οι ROS μπορούν να προκαλέσουν οξείδωση των λιποπρωτεϊνών και κυρίως της LDL, οι οποίες είναι σημαντικός παράγοντας πρόκλησης αθηροσκλήρυνσης (Young and McEneny, 2001; Halliwell and Gutteridge, 1999).

### *Πρωτεΐνες*

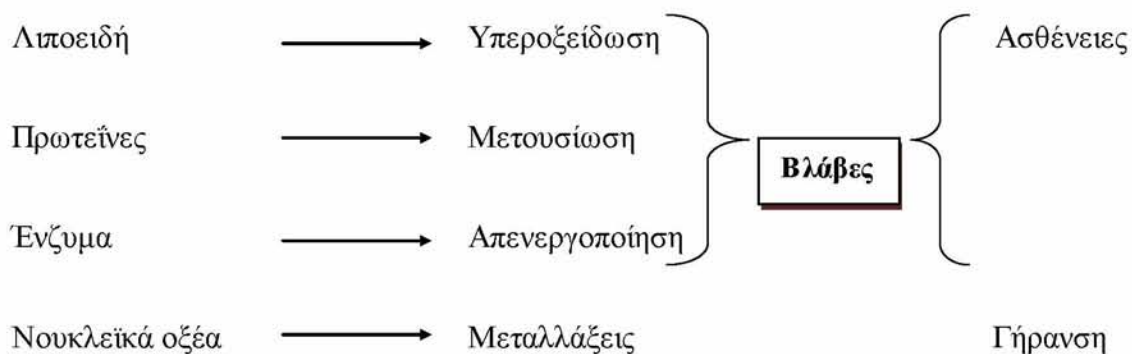
Οι δομικές πρωτεΐνες μπορούν να οξειδωθούν από τις ROS με αποτέλεσμα να τροποποιηθεί η δομή και η λειτουργία τους. Αποτέλεσμα της οξείδωσής τους είναι η δημιουργία καρβονυλικών ομάδων στα αμινοξέων, που συχνά χρησιμοποιούνται ως δείκτες οξειδωτικού στρες. Η καταστροφή των πρωτεϊνών έχει σημαντικές συνέπειες για το κύτταρο, όπως απώλεια ενζυμικής λειτουργίας. Οι οξειδωμένες πρωτεΐνες αποικοδομούνται από το πρωτεάσωμα και τα λυσοσωμάτα. Τα καρβονύλια μεγάλου μοριακού βάρους, όμως, δεν μπορούν να αποικοδομηθούν και συσσωρεύονται



δημιουργώντας συσσωματώματα (Levine and Stadtman, 2001; Grune et al., 1997; Halliwell and Gutteridge, 1999).

### DNA

Αν και το DNA είναι ένα σταθερό και καλά προστατευμένο μόριο, οι ROS μπορούν να αλληλεπιδράσουν με αυτό και να προκαλέσουν βλάβες και να προάγουν στην εμφάνιση μεταλλάξεων. Οι αλληλεπιδράσεις μπορεί να οδηγήσουν σε τροποποίηση των βάσεων, θραύσεις του DNA, απώλεια πουρινών, ζημιά στη δεοξυριβόζη και βλάβη στο σύστημα επιδιόρθωσης του DNA. Η ρίζα υδροξυλίου ( $\text{OH}^\cdot$ ) επιτίθεται στη γουανίνη στη θέση C-8 και σχηματίζει ένα οξειδωτικό προϊόν, την 8-υδροξυγουανίνη (8-OHdG). Οι ρίζες υδροξυλίου μπορούν επίσης να επιτεθούν και σε άλλες βάσεις όπως η αδενίνη για να σχηματίσουν την 8-υδροξυαδενίνη. Η αλληλεπίδραση ανάμεσα στις πυριμιδίνες και στις ρίζες υδροξυλίου οδηγεί στο σχηματισμό υπεροξειδίου της θυμίνης, 5-ουρακίλης, γλυκολών της θυμίνης και άλλων παρεμφερών προϊόντων (Radak et al., 1999; Ames, 1986; Beckman and Koppenol, 1996; Dizdaroglu et al., 2002; Halliwell, 2001; Halliwell and Gutteridge, 1999; Helbock et al., 1999).



#### 1.4. Οξειδωτικό στρες

Ως οξειδωτικό στρες ορίζεται η διαταραχή στην ισορροπία προοξειδωτικών-αντιοξειδωτικών υπέρ των πρώτων (Sies, 1991). Πρόκειται για διαταραχή της ισορροπίας μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της δράσης των αντιοξειδωτικών μηχανισμών των ιστών, με αποτέλεσμα είτε να υπερπαραγονται ελεύθερες ρίζες είτε να παρατηρείται μειωμένη δράση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών του οργανισμού. Οι επιπτώσεις του οξειδωτικού στρες εξαρτώνται από την έκταση των μεταβολών αυτών. Το κύτταρο είναι ικανό να ανακτήσει την αρχική του κατάσταση μετά από περιορισμένη οξειδωτική βλάβη. Σοβαρότερες διαταραχές, ωστόσο οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο, είτε με τη διαδικασία της απόπτωσης, είτε με άμεση κυτταρική νέκρωση.

Ακόμη αρκετά ένζυμα είναι γνωστό ότι έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, όπως η τρανσφεράση γλουταθειόνης-S και οι αφυδρογονάσες αλδεϋδών. Ως αντιοξειδωτικές ενώσεις χαρακτηρίζονται μόρια που αντιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες και τις καθιστούν ακίνδυνες. Οι βιταμίνες A, D και E, καθώς και διάφορα φυτοχημικά, όπως οι φαινόλες, οι πολυφαινόλες και τα φλαβονοειδή που εν δυνάμει εξουδετερώνουν ελεύθερες ρίζες, μειώνουν τον κίνδυνο εμφάνισης πολλών χρόνιων εκφυλιστικών νοσημάτων.

Ο κατάλογος των ασθενειών, που σχετίζονται με την παρουσία ελευθέρων ριζών συνεχώς αυξάνεται (Halliwell, 2001). Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν:

- ο καρκίνος
- οι καρδιαγγειακές παθήσεις
- οι νευροεκφυλιστικές ασθένειες

- η αθηροσκλήρυνση
- το AIDS
- η ηπατίτιδα
- και διάφορες αυτοάνοσες ασθένειες όπως ρευματοειδής αρθρίτιδα

Αναλυτικότερα, στα αποτελέσματα του οξειδωτικού στρες, συγκαταλέγονται η μείωση των αμυντικών συστημάτων του οργανισμού και η οξείδωση μορίων, όπως λιπίδια, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες και DNA. Μάλιστα, πρωτεΐνες που περιέχουν αμινοξέα όπως μεθειονίνη, κυστεΐνη, τρυπτοφάνη, τυροσίνη, φαινυλαλανίνη και ιστιδίνη αντιδρούν πιο εύκολα με ελεύθερες ρίζες με αποτέλεσμα τη μεταβολή της δομής τους και της λειτουργίας τους (Lygas et al, 1977). Στην περίπτωση του DNA, οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν βλάβες τόσο στις βάσεις (πυρίνες, πυριμιδίνες), όσο και στην D-ριβόζη του μορίου. Στα λιπίδια οι ελεύθερες ρίζες προκαλούν υπεροξείδωση που σχετίζεται με τη γήρανση, τον καρκίνο και την αθηροσκλήρυνση (Halliwell and Cross, 1994).

## **2. Αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί**

Η συνεχής έκθεση στις βλαπτικές δράσεις των ελευθέρων ριζών έχει οδηγήσει τους οργανισμούς στην ανάπτυξη μιας σειράς προστατευτικών μηχανισμών. Οι μηχανισμοί αυτοί περιλαμβάνουν προληπτικούς μηχανισμούς, μηχανισμούς επιδιόρθωσης και αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς. Ως αντιοξειδωτικό μπορεί να χαρακτηριστεί οποιαδήποτε ουσία, η οποία, όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση αυτών των υποστρωμάτων. Ο φυσιολογικός ρόλος των αντιοξειδωτικών, όπως προκύπτει από τον ορισμό, είναι η

αποφυγή της βλάβης των κυτταρικών συστατικών, ως συνέπεια των χημικών αντιδράσεων από τις οποίες προκύπτουν ελεύθερες ρίζες και η διατήρηση της οξειδοαναγωγικής ομοιόστασης. Τα αντιοξειδωτικά διακρίνονται σε ενδογενή (κυτταρικές λειτουργίες) και εξωγενή (για παράδειγμα αντιοξειδωτικά που λαμβάνονται από τη διατροφή). (Pham-huy et al., 2008) Οι ενδογενείς αντιοξειδωτικοί μηχανισμοί διακρίνονται σε ενζυμικούς και μη ενζυμικούς (Halliwell & Gutteridge, 2007; Alessio et al., 2005).

## **2.1. Ενζυμικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας**

Οι ενζυμικοί μηχανισμοί προκαλούν τη μετατροπή της ρίζα του υπεροξειδίου ανιόντος και του υπεροξειδίου του υδρογόνου, δυο εξαιρετικά τοξικών προοξειδωτικών, στο ακίνδυνο νερό. Η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) προκαλεί τη μετατροπή της ρίζας υπεροξειδικού ανιόντος σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, ενώ η καταλάση (CAT) και η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX) τη μετασχηματίζουν σε νερό (Oberley et al., 1997). Άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα είναι η αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), η οξυγενάση της αίμης, η τρανσφεράση της γλουταθειόνης και η συνθετάση της γλουταθειόνης.

### **2.1.1. Υπεροξειδική δισμουτάση (SOD)**

Ένα από τα πλέον αποτελεσματικά ενζυμικά αντιοξειδωτικά, η πρώτη αντιοξειδωτική γραμμή άμυνας του οργανισμού, είναι η υπεροξειδική δισμουτάση, η οποία εξουδετερώνει την εξαιρετικά δραστική ρίζα του υπεροξειδικού ανιόντος,  $O_2^{\bullet-}$ , οδηγώντας στη δημιουργία του, λιγότερο δραστικού, υπεροξειδίου του υδρογόνου,  $H_2O_2$ , και του μοριακού οξυγόνου  $O_2$ .

## SOD



Το  $\text{H}_2\text{O}_2$  εξουδετερώνεται στη συνέχεια από την καταλάση ή αντιδρώντας με την υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, σε νερό και οξυγόνο. Η υπεροξειδική δισμουτάση εντοπίζεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα καθώς και στα μιτοχόνδρια και περιέχει Mn στο ενεργό της κέντρο (Valko et al., 2006). Έτσι, το  $\text{O}_2^{\cdot-}$  που παράγεται κατά την οξειδωτική φωσφορλίωση στα μιτοχόνδρια, ανάγεται από την μιτοχονδριακή SOD ενώ όσο διαχέεται στο κυτταρόπλασμα, ανάγεται από την κυτταροπλασματική SOD, η οποία βρίσκεται σε μεγάλα ποσά στα μυϊκά κύτταρα (Mohan and Das, 1997).

### 2.1.2. Καταλάση (CAT)

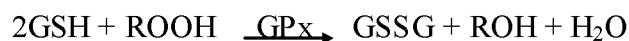
Η καταλάση είναι ένα εξαιρετικά ενεργό ένζυμο το οποίο απαντάται σε φυτικά και ζωικά κύτταρα καθώς και σε ορισμένα αερόβια βακτήρια. Απαντάται κυρίως στο ήπαρ και στα ερυθροκύτταρα, ενώ ενδοκυττάρια εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και στα υπεροξειδισώματα (ή μικροσώματα) και προκαλεί την μετατροπή του  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε νερό και μοριακό οξυγόνο (Masters et al., 1986; Antunes et al., 2002):



Η καταλάση είναι εξαιρετικά ενεργό ένζυμο καθώς ένα μόριο καταλάσης μπορεί να μετατρέψει  $\sim 6 \cdot 10^6$  μόρια  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε νερό και οξυγόνο κάθε λεπτό. Η αδυναμία της εξουδετέρωσης του  $\text{H}_2\text{O}_2$  που εντοπίζεται σε πολλούς καρκινικούς όγκους συνδέεται με χαμηλά επίπεδα καταλάσης σε αυτούς (Valko et al., 2006; Oberley and Oberley, 1997).

### 2.1.3. Υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPX)

Η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης αντιδρά σε συνδυασμό με το τριπεπτίδιο γλουταθειόνη (GSH), η οποία βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις σε όλα τα κύτταρα. Η GPX είναι από τα λίγα ένζυμα που απαιτούν σελήνιο για τη δράση τους. Απαραίτητο υπόστρωμα για να δράσει η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης είναι διάφορα οργανικά υπεροξείδια (ROOH) ή το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) και τα διασπά σε νερό και αλκοόλη με ταυτόχρονη οξείδωση της γλουταθειόνης (σε GSSG). Θεωρείται ότι η γλουταθειόνη ανάγει το σελήνιο στην υπεροξειδάση της γλουταθειόνης GPx και αυτή η ανηγμένη μορφή του ενζύμου καταλύει τη διάσπαση (Valko et al., 2006; Antunes et al., 2002; Halliwell, 2001):



Η δράση της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης εξαρτάται άμεσα από τη συγκέντρωση της γλουταθειόνης. Ο μεταβολισμός της γλουταθειόνης είναι από τους σημαντικότερους μηχανισμούς αντιοξειδωτικής άμυνας του κυττάρου προστατεύοντας τα κύτταρα των ζώντων οργανισμών από το οξειδωτικό στρες.

### 2.1.4. Αναγωγή της γλουταθειόνης (GR)

Τόσο η ενζυμική (διά των υπεροξειδασών της γλουταθειόνης) όσο και η μη ενζυμική αδρανοποίηση των ελευθέρων ριζών από την αναχθείσα γλουταθειόνη (GSH) οδηγεί σε παραγωγή οξειδωμένης γλουταθειόνης (GSSG). Προκειμένου η

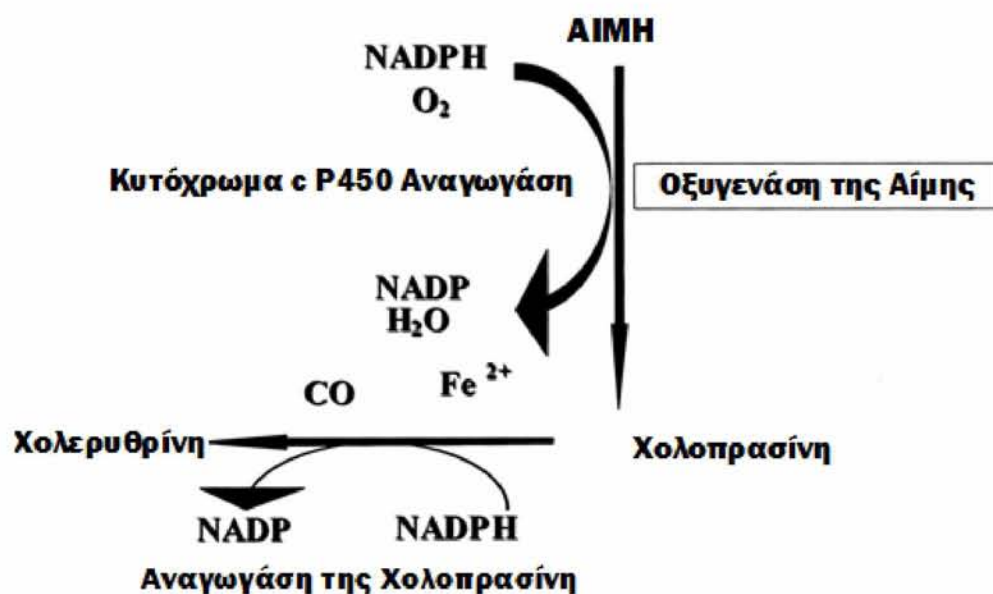
γλουταθειόνη να εκπληρώσει το ρόλο της ως αντιοξειδωτική ουσία, απαιτείται η διατήρηση υψηλής ενδοκυττάριας αναλογίας ανηγμένης (GSH) προς οξειδωμένη γλουταθειόνη (GSSG). Αυτό επιτυγχάνεται με μια βιοχημική αντίδραση, η οποία εξαρτάται από το NADPH. Το NADPH ανάγει το FAD, το οποίο το χρησιμοποιείται από τη GR σαν συνένζυμο. Η GR διατηρεί τη φυσιολογική αναλογία GSH:GSSG στο εσωτερικό του κυττάρου καταλύοντας την αναγωγή της GSSG σε GSH. Η δραστηριότητα της GR μπορεί να αυξηθεί με δύο μηχανισμούς: Αύξηση των επιπέδων/δραστηριότητας της GR ή αύξηση των επιπέδων NADPH (Antunes et al., 2002).



#### 2.1.5. Οξυγενάση της αίμης (OH-1)

Η οξυγενάση της αίμης παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση και στη λειτουργία του μεταβολισμού της αίμης. Καταλύει το πρώτο βήμα για την αποδόμηση της αίμης το οποίο είναι κρίσιμης σημασίας. Τα τελευταία χρόνια οι μελέτες δείχνουν ότι η οξυγενάση της αίμης επάγεται όχι μόνο από το υπόστρωμα της αίμης αλλά και από μία ποικιλία μη αιμικών επαγωγέων όπως βαρέα μέταλλα, ενδοτοξίνες, heat shock πρωτεΐνες, κυτοκίνες και προστανγλαδίνες. Αυτή η ποικιλία των επαγωγέων της, αποδεικνύει ότι η οξυγενάση της αίμης παίζει σημαντικό ρόλο και στη ομοιόσταση των κυττάρων. Επίσης έχει δειχθεί ότι η οξυγενάση της αίμης παίζει σημαντικό ρόλο στην προστασία των κυττάρων από το οξειδωτικό στρες (Pischke et al., 2005; Alam et al., 1999).

Η αίμη, μέσω της HO, καταβολίζεται σε μονοξείδιο του άνθρακα και χολοπρασίνη (biliverdin), καθώς απελευθερώνεται ο σίδηρος, ο οποίος μπορεί να χρησιμοποιηθεί πάλι από τα κύτταρα. Υπάρχουν δύο ισομορφές της οξυγενάσης της αίμης, η HO-1 και η HO-2. Έχουν αντιοξειδωτική ικανότητα και δρουν σαν αντιφλεγμονώδης πρωτεΐνες, όπου προκληθεί οξειδωτική βλάβη. Η HO-2 παράγεται εντός του εγκεφάλου και των όρχεων, ενώ η HO-1 βρίσκεται παντού, αλλά σε χαμηλά επίπεδα όταν ο οργανισμός βρίσκεται σε κατάσταση ηρεμίας. Διάφορες καταπονήσεις, επάγουν την ταχεία παραγωγή της HO-1. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι η HO-1 έχει προστατευτικό ρόλο σε διάφορες φλεγμονώδεις καταστάσεις αλλά καμία νόσος μέχρι στιγμής δεν έχει αποδοθεί σε πρωτογενή ανεπάρκεια της HO-1 (Yachie et al., 1999).



Εικόνα 7. Μεταβολισμός της αίμης.

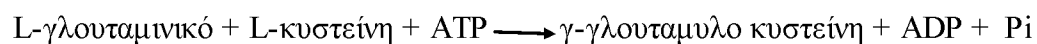


#### 2.1.6. Τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST)

Οι τρανσφεράσες της γλουταθειόνης, αποτελούν μια οικογένεια των προκαρυωτικών και ευκαρυωτικών μεταβολικών ισοενζύμων, οι οποίες καταλύουν τη σύζευξη της ανηγμένης μορφής της γλουταθειόνης (GSH) προς ξενοβιοτικά υποστρώματα, έχοντας σημαντικό ρόλο στην αποτοξίνωση. Καταλύουν τη σύζευξη της GSH – μέσω μιας ομάδας σουλφυδρυλίου – σε ηλεκτρονιόφιλα κέντρα, χρησιμοποιώντας ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, για να καταστούν οι ενώσεις περισσότερο διαλυτές (Douglas, 1987). Η οικογένεια GST αποτελείται από τρεις υπεριοικογένειες: την κυτοσολική, την μιτοχονδριακή και τη μικροσωμική οικογένεια. Εκτός από τον βασικό τους ρόλο να καταλύουν τη σύζευξη των ηλεκτροφιλικών υποστρωμάτων με τη γλουταθειόνη, έχουν και άλλους σημαντικούς ρόλους. Έχουν ικανότητα υπεροξειδάσης και ισομεράσης, μπορούν να αναστείλουν την Jun N-τερματική κινάση (προστατεύοντας έτσι τα κύτταρα από τον θάνατο λόγω του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), μπορούν να δεσμεύσουν τις τοξίνες και να λειτουργήσουν ως πρωτεΐνες μεταφοράς και είναι ικανά να συνδέονται με ένα ευρύ φάσμα ενδογενών και εξωγενών προσδετών (Sheehan et al., 2001).

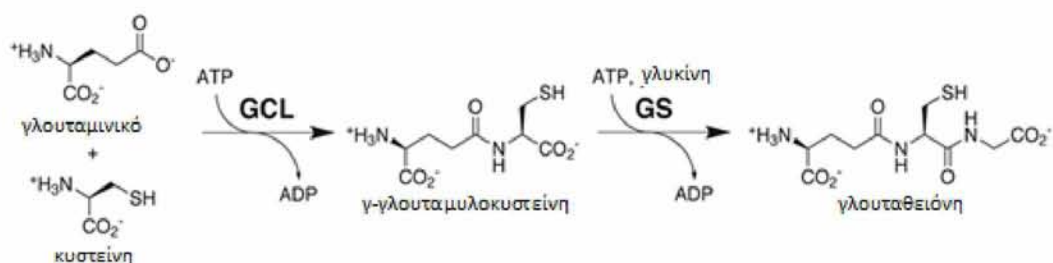
#### 2.1.7. Συνθετάση της γλουταθειόνης (GCL)

Η συνθετάση της γλουταθειόνης (GCL), γνωστή και ως συνθετάση της γάμμα-γλουταμυλοκυστεΐνης (GCS), είναι το πρώτο ένζυμο του μονοπατιού της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης που καταλύει την χημική αντίδραση (Dalton et al., 2004):



Η GSH, και κατ' επέκταση η GCS, είναι σημαντική για την επιβίωση των κυττάρων. Σχεδόν κάθε ευκαρυωτικό κύτταρο, από τα φυτά μέχρι τους ζυμομύκητες και τον άνθρωπο, εκφράζουν μια μορφή της πρωτεΐνης GCS για το σκοπό της σύνθεσης της GSH.

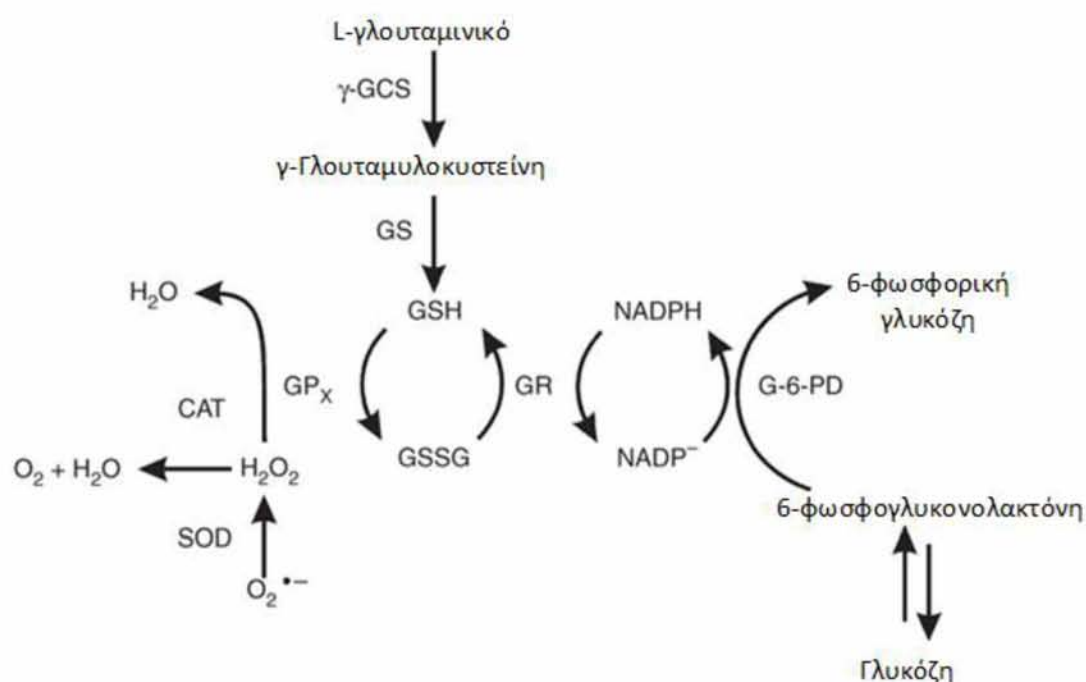
Η GCS καταλύει το πρώτο και σημαντικό βήμα για την παραγωγή της κυτταρικής γλουταθειόνης (GSH), που περιλαμβάνει τη συμπύκνωση της κυστεΐνης και του γλουταμικού, για να σχηματίσει το διπεπτίδιο γ-γλουταμυλ-κυστεΐνης (γ-GC), χρησιμοποιώντας ATP (Franklin et al., 2009). Αυτή η σύζευξη του πεπτιδίου είναι μοναδική διότι λαμβάνει χώρα μεταξύ της αμινομάδας της κυστεΐνης και του καρβοξυλικού οξέος της πλευρικής αλυσίδας του γλουταμικού (Njålsson and Norgren, 2005). Αυτός ο πεπτιδικός δεσμός είναι ανθεκτικός στη διάσπαση από κυτταρικές πεπτιδάσες και απαιτεί ένα εξειδικευμένο ένζυμο, τη γ-γλουταμυλ τρανσπεπτιδάση, για να μεταβολίσει τη γ-GC και τη GSH στα συστατικά της αμινοξέα (Lu, 2009).



Εικόνα 8. Δράση της GCL (GCS)

Η ενζυμική δραστηριότητα της GCS επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένης της κυτταρικής έκφρασης των υπομονάδων της GCS, της πρόσβασης σε υποστρώματα (η κυστεΐνη είναι τυπικά περιορισμένη για την παραγωγή της γ-GC), και επηρεάζεται από μετά-μεταφραστικές τροποποιήσεις σε συγκεκριμένες θέσεις επί των υπομονάδων της GCS (Backos et al., 2013).

Λαμβάνοντας υπόψιν το ρόλο της ως ένζυμο περιορισμού του ρυθμού της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης, οι αλλαγές στη δραστηριότητα της GCS σχετίζονται άμεσα με τις αλλαγές στη κυτταρική ικανότητα βιοσύνθεσης της GSH. Γι' αυτό, θεραπευτικές στρατηγικές για να μεταβάλλουν την παραγωγή της GSH έχουν επικεντρωθεί στη GCS (Griffith and Meister, 1979).



Εικόνα 9. Αντιμετώπιση ελευθέρων ριζών ενδογενώς με το σύστημα της GSH

## 2.2. Μη ενζυμικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής άμυνας

Οι μη ενζυμικοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν ενδογενή και εξωγενή αντιοξειδωτικά μόρια, υδατοδιαλυτές και λιπόφιλες βιταμίνες.

### 2.2.1. Ασκορβικό οξύ (Βιταμίνη C)

Η βιταμίνη C είναι ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό το οποίο δρα σε υδατικά περιβάλλοντα στον οργανισμό, όπως αυτά στα μάτια και στους πνεύμονες. Θεωρείται ίσως το σημαντικότερο υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό. Μετατρέπει τα δραστικά οξυγονούχα είδη σε ελάχιστα δραστικά παράγωγα ασκορβικού. Συνεργάζεται με τη βιταμίνη E, τα καροτενοειδή καθώς και αντιοξειδωτικά ένζυμα (Valko et al., 2006). Προστατεύει τις μεμβράνες από την οξείδωση. Η πλειοψηφία των μελετών συγκλίνει ότι κατόπιν χορήγησης βιταμίνης C μειώνεται η οξείδωση βάσεων του DNA καθώς και η φθορά στα λιπίδια και στις πρωτεΐνες. Άλλες μελέτες δείχνουν προ-αποπτωτική δράση της βιταμίνης C και προστασία από τον κυτταρικό θάνατο μετά από έκθεση σε διάφορα οξειδωτικά ερεθίσματα (Valko et al., 2004).

#### 2.2.2. Βιταμίνη E

Η βιταμίνη E είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη η οποία υπάρχει σε οκτώ διαφορετικές μορφές. Η α-τοκοφερόλη είναι η πιο ενεργή από τις οκτώ μορφές της βιταμίνης E στους ανθρώπους και είναι εξαιρετικά ισχυρό αντιοξειδωτικό, θεωρείται δε το αντιοξειδωτικό το οποίο προστατεύει κατεξοχήν τις κυτταρικές μεμβράνες (λόγω του λιπόφιλου χαρακτήρα του) (Pham-Huy et al., 2008). Κύρια αντιοξειδωτική λειτουργία του είναι η προστασία από τη λιπιδική υπεροξείδωση. Θεωρείται ότι η α-τοκοφερόλη και το ασκορβικό οξύ λειτουργούν μαζί σε μια διαδικασία ανακύκλωσης της βιταμίνης E, με το ασκορβικό οξύ να είναι υπεύθυνο για την αναγέννηση της α-τοκοφερόλης. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η βιταμίνη E είναι μια λιποδιαλυτή βιταμίνη, ενώ το ασκορβικό οξύ ανήκει στην κατηγορία των υδατοδιαλυτών βιταμινών, γεγονός που πιθανώς δημιουργεί πρόβλημα μιας και οι δύο πρωτεΐνες βρίσκονται σε διαφορετική φάση. Όμως, έχει αποδειχτεί ότι στις μεμβράνες η φαινολική υδροξυλική ομάδα της βιταμίνης E βρίσκεται ενδιάμεσα, μεταξύ της μεμβράνης και της υδατικής

φάσης, όπως συμβαίνει και με τις πολικές κεφαλές των φωσφολιπιδίων. Με ανάλογο τρόπο η βιταμίνη Ε προστατεύει και τις LDL από τη λιπιδική υπεροξειδωση και έτσι συμβάλλει στην πρόληψη του σχηματισμού αθηρωματικών πλακών (Παπαγεωργίου, 2005).

Κατά την αντιοξειδωτική αντίδραση η α-τοκοφερόλη μετατρέπεται σε ρίζα α-τοκοφερόλης δίνοντας ένα υδρογόνο σε ένα λιπίδιο ή ρίζα λιπιδικού υπεροξειδίου. Η ρίζα α-τοκοφερόλης ανάγεται στη μητρική μορφή της α-τοκοφερόλης από το ασκορβικό οξύ (Valko et al., 2004; Valko et al., 2006). Η απορρόφηση της α-τοκοφερόλης πραγματοποιείται στο βλεννογόνο του εντερικού σωλήνα και μεταβολίζεται στο ήπαρ. Η απορρόφησης της εξαρτάται από την ικανοποιητική παρουσία χολικών αλάτων, από τις παγκρεατικές εστεράσες και από την περιεκτικότητα της τροφής σε λίπος.

### 2.2.3. Καροτενοειδή

Τα καροτενοειδή είναι χρωστικές οι οποίες βρίσκονται στα φυτά και σε μικροοργανισμούς αλλά δεν μπορούν να συντεθούν σε ζωικούς οργανισμούς. Ευθύνονται για το κόκκινο, κίτρινο και πορτοκαλί χρώμα των φρούτων και των λαχανικών. Περισσότερα από 600 είδη απαντώνται στη φύση με τα κυριότερα της κατηγορίας να είναι το β-καροτένιο και το λυκοπένιο. Ειδικά το β-καροτένιο είναι από τα πλέον ισχυρά αντιοξειδωτικά τα οποία δεσμεύουν το μονήρες οξυγόνο (Pham-Huy et al., 2008). Στα επιθηλιακά κύτταρα του εντέρου, με τη βοήθεια του ενζύμου της β-καροτενοειδή 15, 15' διοξυγονάσης, το β-καροτένιο μπορεί να μετατραπεί σε δύο όμοια μόρια βιταμίνης Α. Δεν έχουν όμως όλα τα καροτενοειδή τη δυνατότητα να συνθέσουν ρετινόλη, ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το λυκοπένιο. Επιπλέον δρουν σταθεροποιώντας τις υπεροξειδικές ρίζες (Valko et al., 2006). Όσα

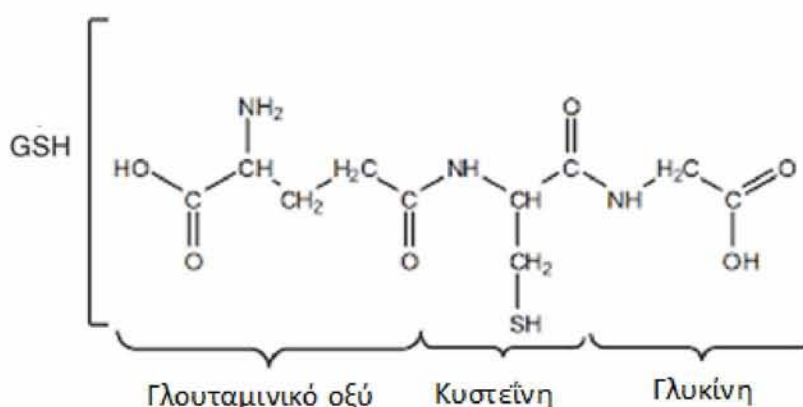
καροτενοειδή κατέχουν ενεργότητα της βιταμίνης Α μπορούν να απορροφηθούν χωρίς να διασπασθούν ή να διασπαστούν σχηματίζοντας βιταμίνη Α και στη συνέχεια να απορροφηθούν στα βλεννογόνα κύτταρα του εντέρου. Οι λιποπρωτεΐνες αποτελούν μέσο μεταφοράς των καροτενοειδών στο πλάσμα. Το λυκοπένιο και το β-καροτένιο μεταφέρονται με τις LDL και εντοπίζονται στον πυρήνα των λιποπρωτεϊνών.

Τα καροτενοειδή είναι ιδιαίτερα ισχυροί απενεργοποιητές του μονήρους οξυγόνου ( $^1\text{O}_2$ ). Ένας τρόπος είναι η διεγερμένη μορφή του  $^1\text{O}_2$  οδηγείται στο καροτονοειδές και εν συνεχεία αποβάλλεται στο περιβάλλον με τη μορφή θερμότητας και ο δεύτερος τρόπος αφορά την χημικά εξουδετέρωση του  $^1\text{O}_2$  από το καροτενοειδές με την εισαγωγή του σε διπλό δεσμό (Παπαγεωγεωργίου, 2005).

#### 2.2.4. Γλουταθειόνη

Το τριπεπτίδιο, L-γ-γλουτάμυλο-L-κυστεΐνυλο-γλυκίνη (L-γ-glutamyl-Lcysteinyl-glycine) ή GSH με μοριακό βάρος 307 είναι η σπουδαιότερη μικρομοριακή θειόλη που έχει βρεθεί σε φυτικά, ζωικά κύτταρα, αερόβια βακτήρια (π.χ. στο *E. coli*) σε συγκεντρώσεις της τάξης των mM, καθώς επίσης σπανιότερα και σε αναερόβια βακτήρια. Με το μόριο αυτό δεν παρατηρούνται τα φαινόμενα τοξικότητας που έχουν αναφερθεί ότι προκαλεί από μόνο του το αμινοξύ κυστεΐνη (Puka-Sundvall et al., 1995) και έτσι έχει επιλεγεί στη φύση ως το πλέον κατάλληλο μόριο για να διευθετήσει τη θειολική οξειδοαναγωγική ισορροπία που χαρακτηρίζεται από την αναλογία των θειολών προς τα δισουλφίδια. Η παρουσία γ-πεπτιδικού δεσμού στο μόριο το καθιστά ανθεκτικό στην αποικοδόμηση μέσω αμινοπεπτιδασών.

Το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης GSSG (Εικόνα 10), συχνά αναφερόμενο και ως οξειδωμένη γλουταθειόνη, προκύπτει ύστερα από οξείδωση και σχηματισμό δισουλφιδικής γέφυρας μεταξύ δύο μορίων γλουταθειόνης. Εκτός όμως από την οξείδωση με τον εαυτό του, το μόριο της γλουταθειόνης μπορεί να σχηματίσει δισουλφιδική γέφυρα και με άλλα μικρού μοριακού βάρους μόρια όπως ελεύθερη κυστεΐνη, συνένζυμο Α, καθώς και με θειολικές ομάδες πρωτεϊνών (Sies, 1999).



Εικόνα 10: Δομή της γλουταθειόνης

Το μεγαλύτερο ποσοστό της γλουταθειόνης του κυττάρου εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και μόνο το 10% βρίσκεται στα μιτοχόνδρια. Τα μιτοχόνδρια στερούνται ενζύμων σύνθεσης GSH και γι' αυτό πρέπει να την προσλάβουν από το κυτταρόπλασμα. Επιπρόσθετα, ένα μέρος της GSH βρίσκεται και στον πυρήνα (Halliwell and Gutteridge, 1998).

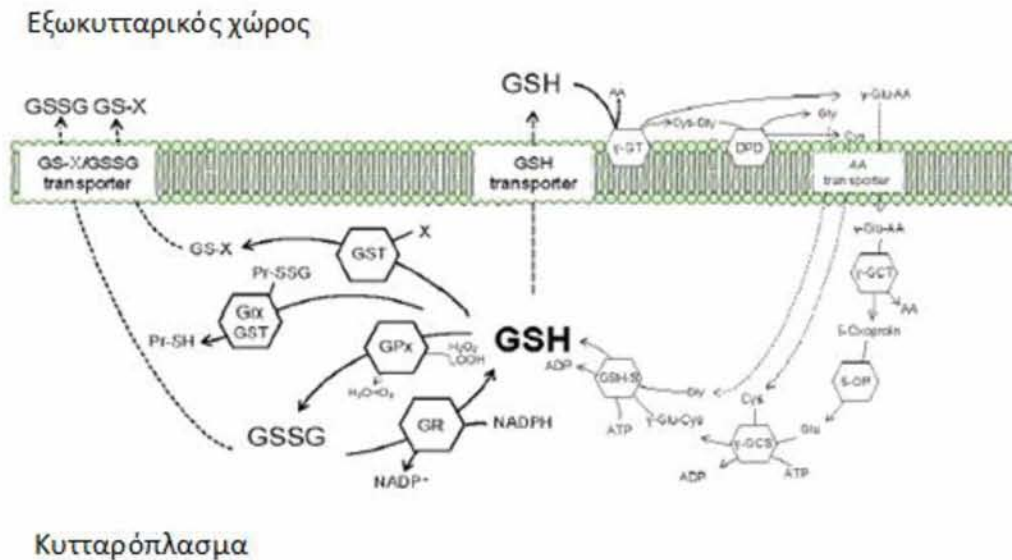
Ρόλος της γλουταθειόνης:

1. Η GSH είναι ευρέως διαδεδομένη σε κατώτερους και ανώτερους οργανισμούς και θεωρείται ως ο σημαντικότερος ρυθμιστής της ενδοκυττάριας

οξειδοαναγωγικής κατάστασης και συμμετέχει στις οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις μέσω της αντιστρεπτής οξείδωσης της ενεργής της θειολικής ομάδας (Mendoza-Cozatl et al., 2005).

2. *In vitro* η GSH αντιδρά άμεσα και εξουδετερώνει τη ρίζα υδροξυλίου, το υποχλωριώδες οξύ, το υπεροξυνιτρώδες, υπεροξυλικές και αλκοξυλικές ρίζες, ελεύθερες ρίζες με κέντρο το άτομο του άνθρακα και το μονήρες οξυγόνο (Halliwell and Gutteridge, 1998).
3. Ανάγει άμεσα το οξειδωμένο ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) ή μέσω της αναγωγάσης του διϋδροασκορβικού (May et al., 2003). Ο κύκλος γλουταθειόνης-ασκορβικού οξέος στους χλωροπλάστες των φυτικών κυττάρων είναι γνωστός ως κύκλος Foyer-Halliwell-Asada (Halliwell and Gutteridge, 1998).
4. Υπάρχουν πολλές ενδείξεις ότι συμμετέχει στην ανακύκλωση της βιταμίνης E σε ορισμένα μεμβρανικά συστήματα (Halliwell and Gutteridge, 1998).
5. Εμποδίζει την οξείδωση των -SH ομάδων στις πρωτεΐνες. Έχει βρεθεί ότι η GSH αναστέλλει την καταλάση (Sun and Oberley, 1989), ενώ εμπλέκεται και σε πολλές κυτταρικές λειτουργίες, όπως στη μεταγωγή κυτταρικών σημάτων, στην έκφραση γονιδίων και στην απόπτωση (Sies, 1999).





Εικόνα 11: Σχηματική απεικόνιση του συστήματος της γλουταθειόνης (GSH). Η ομοιοστάση της GSH, περιλαμβάνει ενδοκυτταρικούς και εξωκυτταρικούς μηχανισμούς. Τα συζυγή γλουταθειόνης (GS-X) και η GSSG, μεταφέρονται έξω από το κύτταρο μέσω GS-X/GSSG αντλιών. Η NADPH-εξαρτώμενη GSH αναγωγή (GR) είναι υπεύθυνη για την ενδοκυτταρική ανακύκλωση της GSH, ενώ η εξωκυτταρική GSH διαδοχικά υδρολύεται από τη γ-γλουτάμυλο τρανσπεπτιδάση (γ-GT) και τη διπεπτιδάση (DPD), για την ανακύκλωση των αμινοξέων γλυκίνη, κυστεΐνη και γλουταμινικό για την σύνθεση της GSH.

#### 2.2.5. Συνένζυμο Q

Το συνένζυμο Q10 είναι ένα σημαντικότερο αντιοξειδωτικό στοιχείο, που όμως εμφανίζει και άλλες αξιόλογες επιδράσεις στον ανθρώπινο οργανισμό. Το συνένζυμο Q10 είναι μια λιπιδική δομή με δραστηριότητα συνενζύμου. Υπάρχουν διάφοροι τύποι συνενζύμων (γνωστά και ως ουβικινόνες - ubiquinones), αλλά αυτό που συναντάται φυσικά σ' όλα τα ανθρώπινα κύτταρα είναι το συνένζυμο Q10. Οι εξέχουσες αντιοξειδωτικές ιδιότητες του, συνοψίζονται τόσο στην αυτούσια δράση του ως δεσμευτής των ελευθέρων ριζών, αλλά και στη συνεισφορά του ως διεγέρτης της επαναφοράς της βιταμίνης E στην ενεργή της μορφή, έπειτα από την αντίδρασή της με κάποια ελεύθερη ρίζα. Το συνένζυμο Q10 το παράγει ο οργανισμός μας αλλά το παίρνουμε και μέσω κάποιων τροφών (όπως το σκουμπρί). Επίσης, το συνένζυμο

Q10 εντοπίζεται και στα τρόφιμα (κυρίως στο κρέας), αλλά το μαγείρεμα και οι μέθοδοι κατεργασίας το καταστρέφουν. Το συνένζυμο Q10 δρα σε ένα θεμελιώδες βιοχημικό επίπεδο ως φορέας στην αλυσίδα «μεταφοράς ηλεκτρονίων». Αυτή η αλυσίδα είναι το τελικό στάδιο της πολύπλοκης διαδικασίας παραγωγής ενέργειας από την τροφή και η οποία καταλήγει στο σχηματισμό ATP (τριφωσφορική αδενοσίνη), που αποτελεί το άμεσο ενεργειακό «νόμισμα» για κάθε κύτταρο. Η ενδογενής σύνθεση του Q10 εξαρτάται από την επάρκεια των αμινοξέων τυροσίνη και φαινυλαλανίνη, αλλά και από την συμμετοχή 7 ακόμα βιταμινών και αρκετών ιχνοστοιχείων. Κάθε λοιπόν έλλειψη σε έναν από τους προδρόμους της σύνθεσης του Q10, μπορεί να οδηγήσει σε ανεπαρκή παραγωγή, αυτού του πολύτιμου συνενζύμου (Halliwell and Gutteridge, 1998).

#### 2.2.6. Ουρικό οξύ

Το ουρικό οξύ βρίσκεται τόσο στα κύτταρα όσο και σε όλα τα υγρά του σώματος σε μικρές συγκεντρώσεις. Είναι το τελικό προϊόν του μεταβολισμού των πουρινών για το ανθρώπινο είδος και αντίδραση για το σχηματισμό του καταλύεται από την οξειδάση της ξανθίνης. Το ουρικό οξύ λειτουργεί ως αντιοξειδωτικό μέσο, παρέχοντας ηλεκτρόνια και έτσι δρα προστατευτικά ενάντια στις οξειδωτικές βλάβες (Valko et al., 2004). Κατά τη διάρκεια της άσκησης αυξάνονται τα επίπεδα του ουρικού οξέος στο πλάσμα του αίματος (Green and Fraser, 1988). Από εκεί μπορεί να διαχυθεί στα μυϊκά κύτταρα και τα προστατεύει από τις ROS.

### 2.2.7. Χολερυθρίνη

Η χολερυθρίνη δημιουργείται από την δράση του ενζύμου χολοπράσινη ρεδουκτάση (biliverdin reductase) επί της χολοπρασίνης (biliverdin). Η χολοπρασίνη είναι προϊόν του καταβολισμού της αίμης και αποτελεί μία πράσινη τετραπυρολική χολοχρωστική. Η χολοπρασίνη ρεδουκτάση αφαιρεί το διπλό δεσμό μεταξύ του δεύτερου και του τρίτου πυρρολικού δακτυλίου. Στη συνέχεια η χολερυθρίνη οξειδώνεται και μετατρέπεται ξανά σε χολοπράσινη (Jansen and Daiber, 2012). Σε μελέτες in vitro φαίνεται να αναστέλλει τη παραγωγή του σουπεροξειδίου από τα ουδετερόφιλα. Επιπλέον, εξουδετερώνει το μονήρες οξυγόνο και αποτελεί ισχυρό παράγοντα απομάκρυνσης της υπεροξειδικής ρίζας. Συνδεόμενη η χολερυθρίνη με την αλβουμίνη, προστατεύει από τις ελεύθερες ρίζες τόσο την αλβουμίνη όσο και τα λιπαρά οξέα που μεταφέρονται από αυτή. Η αέναη αυτή κυκλική διαδικασία, σε συνδυασμό με τη δραστική αντιοξειδωτική λειτουργικότητα της χολερυθρίνης, έχει οδηγήσει στην υπόθεση ότι ο βασικός της ρόλος είναι η αντιοξειδωτική δράση της στα κύτταρα (Choi and Alam, 1996).

### **3. Πολυφαινόλες**

Οι φυτικές πολυφαινόλες, ευρύτατα διαδεδομένες στο φυτικό βασίλειο, είναι δευτερογενείς μεταβολίτες απαραίτητοι για τη φυσιολογία των φυτών. Συνιστούν την φυσική άμυνα του φυτού απέναντι σε μολύνσεις από βακτήρια μύκητες και ιούς αλλά τις βλαβερές επιδράσεις της UV ακτινοβολίας, του όζοντος καθώς και περιβαλλοντολογικών μολύνσεων (Korkina et al., 2009). Επιπλέον επιδρούν στους μηχανισμούς ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού των φυτών.

Οι δευτερογενείς αυτοί μεταβολίτες προέρχονται από τον μεταβολισμό πρωτογενών μεταβολιτών, κυρίως αμινοξέων και υδατανθρακών, μέσω μεθυλίωσης, υδροξυλίωσης και γλυκοξυλίωσης. Μέχρι σήμερα χιλιάδες δευτερογενείς μεταβολίτες έχουν αναγνωριστεί, οι οποίοι κατατάσσονται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες τα τερπένια, τις πολυφαινόλες και τα μόρια που περιέχουν άζωτο (Korkina et al., 2009). Οι πολυφαινόλες αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία, έχουν αναγνωριστεί πάνω από 8000 διαφορετικές δομές, διακρίνονται σε φλαβονοειδή, φαινυλοπροπανοειδή, κουρκουμινοειδή, ταννίνες κ.α. (Rahman et al., 2006). Κοινό χαρακτηριστικό όλων των ειδών είναι ότι διαθέτουν μια κοινή δομή, αρωματικό δακτύλιο (ή και περισσότερους) υποκατεστημένο με τουλάχιστον μια υδροξυλομάδα, δηλαδή αποτελούν φαινολικές ενώσεις (Duthie et al., 2003). Ολοένα και περισσότερα στοιχεία αποδίδουν τις ωφέλιμες για την υγεία ιδιότητες των φυτών, των φρούτων, των βοτάνων, αλλά και τροφίμων και ποτών φυτικής προέλευσης στις πολυφαινόλες. Συνήθως οι πολυφαινόλες είναι περίπλοκα σύμπλοκα περισσοτέρων του ενός πολυφαινολικών μορίων τα οποία προέρχονται από διμερισμό ή πολυμερισμό απλούστερων μορίων (Korkina et al., 2009).

### **3.1. Κατηγορίες Πολυφαινολών**

Οι πολυφαινόλες χωρίζονται σε διαφορετικές κατηγορίες ανάλογα με τον αριθμό των αρωματικών δακτυλίων που περιέχουν και τις ομάδες που είναι συνδεδεμένες σε αυτούς. Σύμφωνα με το συγκεκριμένο κριτήριο, σχηματίζονται οι εξής ομάδες (Manach et al., 2004):

- φλαβονοειδή,
- πολυφαινολικά οξέα,
- στυλβένια
- λιγνάνες

### 3.1.1. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι μια μεγάλη κατηγορία οργανικών ενώσεων που μπορεί να υπάρχουν είτε ως μονομερή είτε πολυμερίζονται αντιδρώντας με άλλα φλαβονοειδή, με σάκχαρα, με μη φλαβονοειδή ή με συνδυασμούς αυτών των ενώσεων. Τα φλαβονοειδή είναι η καλύτερα μελετημένη κατηγορία πολυφαινόλων, περιλαμβάνει περισσότερες από 5000 ενώσεις και χωρίζεται σε 13 υποκατηγορίες. Χαρακτηριστικό των φλαβονοειδών είναι οι δύο αρωματικοί δακτύλιοι που συνδέονται μέσω ενός πυρανικού δακτυλίου που περιέχει οξυγόνο. Τα φλαβονοειδή διακρίνονται κυρίως σε 6 κατηγορίες: τις φλαβονόλες (π.χ. κερκετίνη, ρουτίνη, καμπφερόλη και μυρικετίνη), τις φλαβόνες (π.χ. απιγενίνη και λουτεολίνη), τις ισοφλαβόνες (π.χ. γενιστεΐνη και δαϊντζεΐνη), τις φλαβανόνες (π.χ. ναριγενίνη και εσπεριτίνη), τις ανθοκυανιδίνες (π.χ. κυανιδίνη, δελφινιδίνη και μαλβιδίνη) και τις φλαβανόλες (π.χ. κατεχίνη, επικατεχίνη και γαλλοκατεχίνη). Οι ενώσεις αυτές μπορούν να δρουν προστατευτικά έναντι των βλαβών που προκαλούνται στα κύτταρα από τη δράση των ελευθέρων ριζών. Τα φλαβονοειδή φαίνεται να συμβάλλουν στη χαμηλή συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας νόσου (Lange et al., 2007; Renaud et al., 1992), όπως έδειξε το ‘γαλλικό παράδοξο’.

Επίσης, τα φλαβονοειδή μπορεί να αντιδρούν με σάκχαρα όπως η D-γλυκόζη, η L-ραμνόζη, η γαλακτόζη, η αραβινόζη και η λιγνίνη και να σχηματίζουν γλυκοσυλιωμένες μορφές (Soleas et al., 1997; Ferguson, 2001; Samman et al., 1996).

Εν τούτοις, τα φλαβονοειδή δεν είναι αμιγώς αντιοξειδωτικές ενώσεις αλλά παρουσιάζουν και προ-οξειδωτική δράση. Αυτό το φαινόμενο εξηγείται με βάση την

*in vivo* τοξικότητα ορισμένων φλαβονοειδών. Ακόμα και σε αυτή τη περίπτωση, η δράση τους μπορεί να είναι ωφέλιμη, δεδομένου ότι μια ήπια αύξηση του οξειδωτικού στρες θα ενεργοποιήσει ταυτόχρονα και την αύξηση της αντιοξειδωτικής άμυνας του οργανισμού (Procházková et al., 2011).

### 3.1.2. Φλαβανόλες

Χαρακτηριστικό παράδειγμα φλαβανολών είναι οι κατεχίνες (μονομερή) και οι προκυανιδίνες (πολυμερή), βρίσκονται σε πολλά φρούτα (π.χ. βερύκοκα και σταφύλια) και στο κρασί αλλά οι σημαντικότερες πηγές είναι το πράσινο τσάι και η σοκολάτα. Μάλιστα, κατά τη ζύμωση του πράσινου τσαγιού παράγονται πολύπλοκες πολυφαινόλες όπως είναι οι ταννίνες. Κύρια πηγή των φλαβανολών αποτελούν τα εσπεριδοειδή που περιέχουν την εσπεριδίνη. Στην ίδια κατηγορία πολυφαινολών συναντούμε τη ναρινγενίνη και τη ταξιφολίνη (Manach et al., 2004).

### 3.1.3. Φλαβόνες

Οι φλαβόνες απαντώνται στο σέλινο (λουτεολίνη) καθώς επίσης και στο κόκκινο γλυκό πιπέρι (απιγενίνη). Ακόμα, στο μαϊντανό, στα δημητριακά (κυρίως σε γλυκοσυλιωμένη μορφή), στα αμύγδαλα και στα εσπεριδοειδή (κυρίως σε πολυμεθοξυλιωμένες μορφές) (Wijeratne et al., 2006).

### 3.1.4. Φλαβονόλες

Η κυριότερη φλαβονόλη είναι η κερκيتينή, καθώς και η καμφερόλη, η μυρικετίνη και η φισετίνη. Οι φλαβονόλες βρίσκονται στις περισσότερες φυτικές τροφές που καταναλώνονται από τον άνθρωπο και οι σημαντικότερες πηγές τους είναι τα κρεμμύδια, τα πράσσα, τα μπρόκολα, τα βατόμουρα, το κρασί και το τσάι (Manach et al., 2004).

### 3.1.5. Φλαβανόνες

Οι φλαβανόνες βρίσκονται στις τομάτες, σε αρωματικά φυτά όπως η μέντα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις στα εσπεριδοειδή (Rangel-Huerta et al., 2015).

### 3.1.6. Ισοφλαβόνες

Οι ισοφλαβόνες βρίσκονται στη σόγια και αντιπροσωπεύονται από τη γενιστεΐνη και τη δαϊδζεΐνη. Η δομή τους είναι παρόμοια με εκείνη των οιστρογόνων. Οι ισοφλαβόνες υποστηρίζεται ότι ασκούν μια καρδιοπροστατευτική δράση. Επίσης συμβάλλουν και στη βελτίωση της λειτουργίας του ενδοθηλίου. Όμως αυτή η θεωρία απορρέει από περιορισμένες μελέτες (Cheng et al., 2010). Η πιθανή ευεργετική επίδραση των ισοφλαβονών στον ανθρώπινο οργανισμό δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως και απαιτεί περαιτέρω έρευνα. Εκτός αυτού, έχουν την ικανότητα να ασκούν προστατευτική δράση στο ήπαρ έναντι της προκαλούμενης από ξενοβιοτικά ηπατοτοξικότητας (Widyarini et al., 2012; Sakran et al., 2014 ).

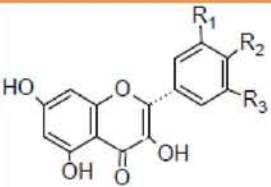
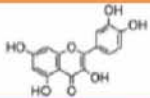
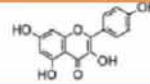
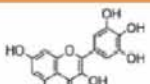
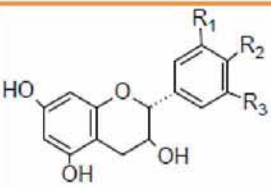
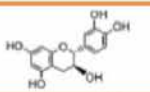
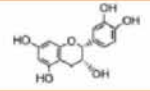
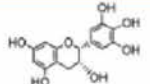
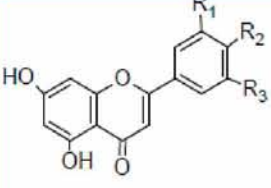
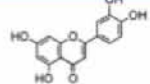
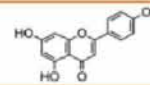
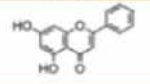
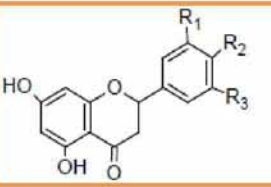
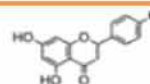
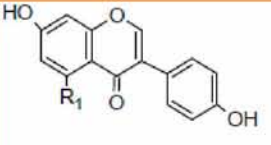
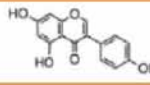
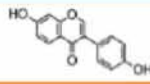
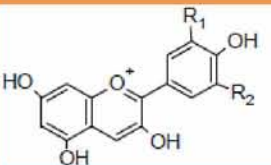
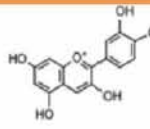
### 3.1.7. Ανθοκυανιδίνες

Στις ανθοκυανιδίνες οφείλεται το κόκκινο και το μπλε χρώμα πολλών φρούτων και λαχανικών (κόκκινο λάχανο, μελιτζάνες, κόκκινα κρεμμύδια, φράουλες). Οι προ-ανθοκυανιδίνες φαίνεται να μειώνουν στον ορό του αίματος, τα επίπεδα της γλυκόζης, της γλυκοζυλιωμένης πρωτεΐνης καθώς και της ουρίας. Επίσης, συμβάλλουν στην καταστολή της παραγωγής των δραστικών μορφών οξυγόνου ενώ παράλληλα αυξάνουν το λόγο GSH/GSSG. Επιπλέον, επιδρούν στην υπερλιπιδαιμία, μειώνοντας σημαντικά τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων, της ολικής χοληστερόλης και των μη απαραίτητων λιπαρών οξέων. Οι προανθοκυανιδίνες (και συγκεκριμένα τα oligομερή αυτών) ασκούν προστατευτική δράση έναντι της

υπεργλυκαιμίας και της υπερλιπιδαιμίας που παρουσιάζουν οι διαβητικοί ασθενείς (και του διαβήτη τύπου I και τύπου II) και λειτουργούν ως ρυθμιστές σε φλεγμονώδεις καταστάσεις που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες (Mansouri et al., 2015; Chen et al., 2015). Οι ανθοκυανιδίνες βρίσκονται στο κρασί, σε ορισμένα είδη δημητριακών, στα λαχανικά (π.χ. στο λάχανο, στα φασόλια, στη μελιτζάνα) αλλά είναι περισσότερο άφθονα στα φρούτα (Kozłowska et al., 2014; Pascual-Teresa et al., 2010).



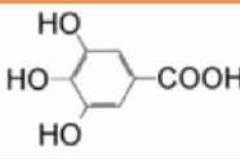
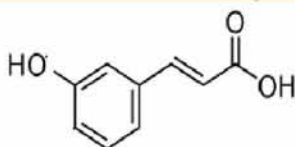
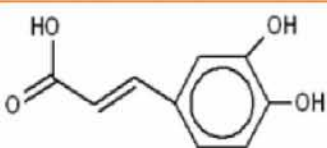
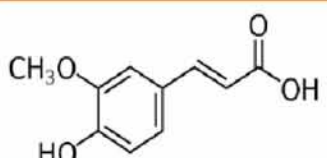
Πίνακας 1. Κατηγορίες φλαβονοειδών

Τάξη των φλαβονοειδών	Γενική χημική δομή R <sub>1</sub> ,2,3: -OH ή -H	Χαρακτηριστικά φλαβονοειδή
Φλαβονόλες		Κερκετίνη 
		Καιμπφερόλη 
		Μυρικετίνη 
Φλαβανόλες		(+)-Κατεχίνη 
		(-)-Επικατεχίνη 
		Επιγαλλοκατεχίνη 
Φλαβόνες		Λουτεολίνη 
		Απιγενίνη 
		Χρυσίνη 
Φλαβανόνες		Ναριγενίνη 
Ισοφλαβόνες		Γενιστεΐνη 
		Ντετζεΐνη 
Ανθοκυανιδίνες		Κυανιδίνη 

### 3.1.8. Πολυφαινολικά οξέα

Η δεύτερη μεγαλύτερη κατηγορία πολυφαινολών μετά τα φλαβονοειδή αποτελούν τα πολυφαινολικά οξέα, τα οποία είναι παράγωγα του υδροξυβενζοϊκού και του υδροξυκινναμικού οξέος. Τα υδροξυβενζοϊκά οξέα (π.χ. γαλλικό οξύ, πρωτοκατεχοϊκό οξύ) βρίσκονται σε μικρές συγκεντρώσεις στα μέρη των φυτών που μπορούν να καταναλωθούν από τον άνθρωπο με εξαίρεση ορισμένων φυτών (π.χ. τσάι), ενώ αποτελούν συνήθως υπομονάδες πολυμερών όπως οι υδρολύόμενες ταννίνες (Zamora-Ros et al., 2013). Τα υδροξυκινναμικά οξέα βρίσκονται περισσότερο συχνά στα φυτά από τα υδροξυβενζοϊκά, και τα κυριότερα μέλη τους είναι το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, το φερουλικό οξύ και τα σιναπικά οξέα. Συνήθως τα υδροξυκινναμικά οξέα γλυκοσυλιώνονται ή σχηματίζουν εστέρες με το κουινικό οξύ, το σικιμικό οξύ και το ταρταρικό οξύ. Το καφεϊκό οξύ και το κουινικό οξύ σχηματίζουν το χλωρογενικό οξύ που συναντάται σε πολλά φρούτα καθώς και στον καφέ (Ludwig et al., 2014; Gazzani et al., 2012). Το καφεϊκό οξύ, γενικά, είναι το πιο κοινό πολυφαινολικό οξύ και αντιπροσωπεύει το 75-100% των συνολικών υδροξυκινναμικών οξέων που υπάρχουν στα περισσότερα φυτά. Το φερουλικό οξύ είναι το πιο άφθονο πολυφαινολικό οξύ των δημητριακών σπόρων, που αποτελούν και την κύρια πηγή πρόσληψής του από τον άνθρωπο (Klepacka and Fornal, 2006; Mathew and Abraham, 2006).

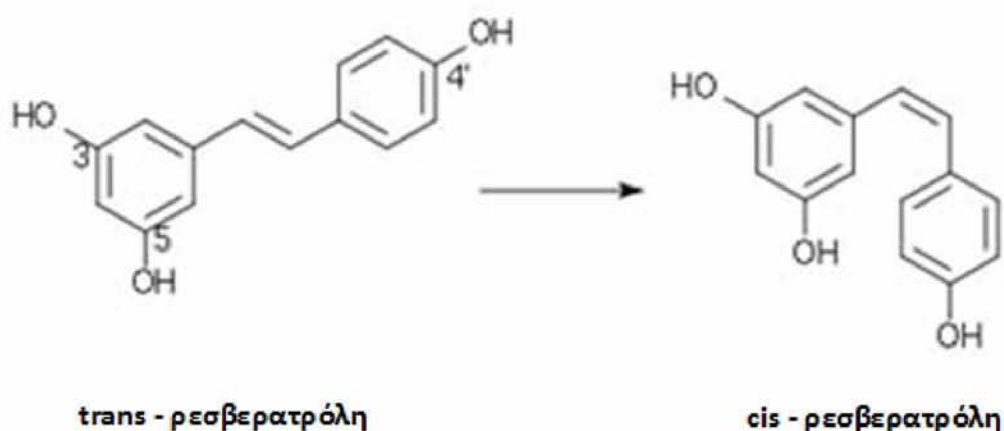
Πίνακας 2. Χημική δομή πολυφαινολικών οξέων

Πολυφαινολικά Οξέα	Συστηματική Ονομασία	Χημική Δομή	Μοριακός Τύπος
<b>Γαλλικό Οξύ</b>	3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ		$C_7H_6O_5$
<b>Κουμαρικό Οξύ</b>	3 - (4 -υδροξυφαινυλο) -2 ακρυλικό		$C_9H_8O_3$
<b>Καφεϊκό οξύ</b>	3 - (3,4-διυδροξυ-φαινυλ)-2-προπenoϊκό οξύ		$C_9H_8O_4$
<b>Φερουλικό οξύ</b>	4 - υδροξυ-3 - μεθοξυ-κινναμικό οξύ		$C_{10}H_{10}O_4$

### 3.1.9. Στιλβένια

Στην κατηγορία των στιλβενίων αντιπροσωπευτική χημική ένωση είναι η ρεσβερατρόλη. Είναι λιγότερο διαδεδομένη στη διατροφή σε σχέση με άλλες πολυφαινόλες. Βρίσκεται γενικά στο κρασί και ειδικά στο κόκκινο. Έρευνες έχουν δείξει την αντιοξειδωτική της δράση, κυρίως όσον αφορά τα καρδιαγγειακά νοσήματα (Baczko and Light, 2015; Sung and Dyck, 2015; Carrizzo et al., 2013). Τα στιλβένια (π.χ. ρεσβερατρόλη, αστρινγίνη, πικεΐδη) αποτελούν ένα μικρό ποσοστό των πολυφαινολών που προσλαμβάνονται μέσω της διαίτας. Το σημαντικότερο μέλος τους είναι η ρεσβερατρόλη που αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους ενωμένους με μία γέφυρα μεθυλενίου και βρίσκεται κυρίως στα σταφύλια και το κρασί (Bertelli et al., 1998; Flamini et al., 2013). Είναι μία από τις καλύτερα μελετημένες πολυφαινόλες γιατί έχει παρουσιάσει σημαντική αντικαρκινική δράση.

Η ρεσβερατρόλη στα σταφύλια βρίσκεται είτε ως μονομερές είτε πολυμερίζεται σχηματίζοντας τις βινιφερίνες (Soleas et al., 1997).



Εικόνα 12. Δομή trans και cis ρεσβερατρόλης

### 3.1.10. Λιγνάνες

Οι λιγνάνες σχηματίζονται από δύο φαινυλπροπανικές ομάδες. Η κυριότερη πηγή τους είναι ο λιναρόσπορος, ενώ δημητριακά, φρούτα και λαχανικά περιέχουν μικρές ποσότητες λιγνάνων (Adlercreutz and Mazur, 1997). Οι λιγνάνες έχουν μελετηθεί για τον προστατευτικό τους ρόλο σε καρδιαγγειακές ασθένειες (Chun et al., 2014).

Παρόλο που η σημασία των πολυφαινολών είναι εξαιρετικά μεγάλη, η αξιολόγηση των φυσιολογικών επιδράσεων συγκεκριμένων φυσικών φαινολικών αντιοξειδωτικών είναι εξίσου δύσκολη. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας του γεγονότος ότι υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός από συστατικά που ενδεχομένως να έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες και περιέχονται στο ίδιο τρόφιμο. Για παράδειγμα, πάνω από εξήντα διαφορετικά χημικά φλαβονοειδή περιέχονται στο κόκκινο κρασί. Αν και έχει διεξαχθεί ένας μεγάλος αριθμός πειραμάτων σχετικά με τα οφέλη των τροφίμων

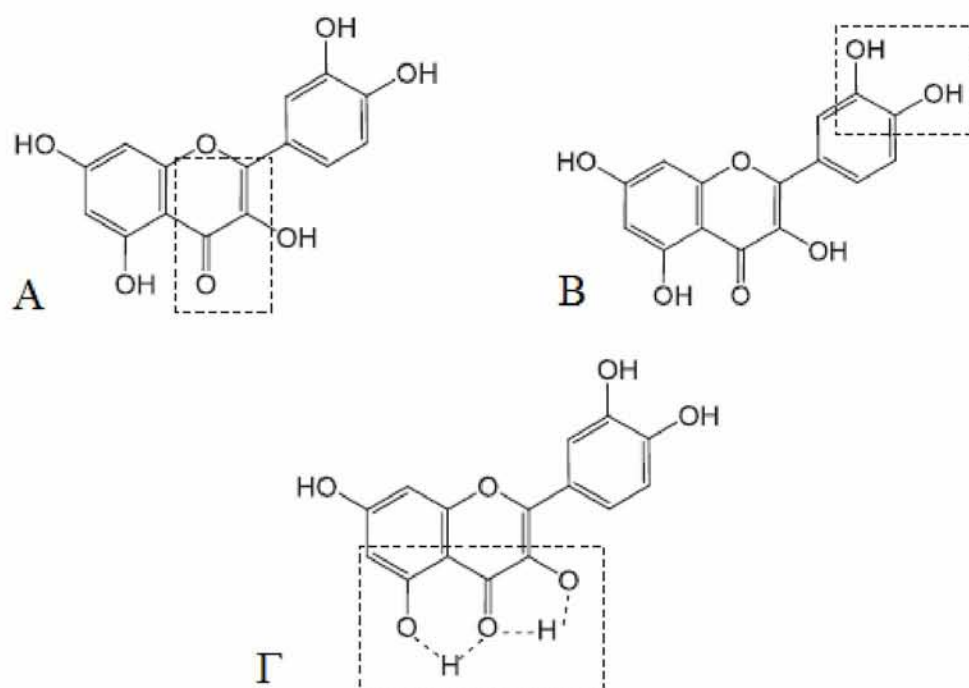
πλούσιων σε πολυφαινόλες, για το οξειδωτικό στρες και τις υπερλιπιδαιμίες, εντούτοις τα αποτελέσματα που προκύπτουν θα χαρακτηρίζονταν ασαφή. Ωστόσο, τα συνεπέστερα ευρήματα ερευνών αφορούν το γεγονός ότι οι πολυφαινόλες δρουν ευεργετικά στην ενδοθηλιακή λειτουργία και στην ομοιόσταση. (Manach C, 2005; Baczkó and Light, 2015; Sung and Dyck, 2015; Carrizzo et al., 2013).

### **3.2. Αντιοξειδωτική δράση πολυφαινολών**

Η χημική σύνθεση των πολυφαινολών τις καθιστά ιδανικές αντιοξειδωτικές ενώσεις και έχειδειχτεί ότι είναι περισσότερο αποτελεσματικά αντιοξειδωτικά από τη βιταμίνη E και το ασκορβικό σε επίπεδο κυττάρου (Blokhina et al., 2003; Prochazkova et al., 2011). Η βιολογική δράση των πολυφαινολών και των φλαβονοειδών ειδικότερα εξαρτάται άμεσα και ισχυρά από την έκταση, τη φύση και τη θέση των υποκαταστατών, κυρίως όμως από τον αριθμό των ομάδων υδροξυλίου στο μόριο του φλαβονοειδούς. Ειδικότερα, τα φλαβονοειδή τα οποία διαθέτουν υδροξυλομάδες στις θέσεις 3 και 4 του B δακτυλίου έχουν την ισχυρότερη αντιοξειδωτική ικανότητα (Valko et al., 2006; Prochazkova et al., 2011). Τα απαραίτητα δομικά χαρακτηριστικά για να είναι αποτελεσματικό το φλαβονοειδές στη δέσμευση των ελευθέρων ριζών παραθέτονται στην εικόνα 13.

Τα φλαβονοειδή δρουν ενάντια στο οξειδωτικό στρες εκκαθαρίζοντας άμεσα δραστικά μορφές οξυγόνου αλλά και ενεργοποιώντας αντιοξειδωτικά ένζυμα (Rice-Evans et al., 1996; Nijveldt et al., 2001). Επιπρόσθετα, προκαλούν αντιδράσεις χηλικοποίησης μετάλλων (κυρίως σιδήρου) και αυξάνουν τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες αντιοξειδωτικών χαμηλού μοριακού βάρους (Ferrali et al., 1997; Pietta, 2000; Lotito and Frei, 2006). Άλλες αντιοξειδωτικές τους δράσεις περιλαμβάνουν

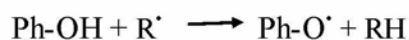
καταστολή των οξειδασών και του νιτρικού στρες (οξειδωτικό στρες το οποίο προκαλείται από το νιτρικό οξύ) (Prochazkova et al., 2011).



Εικόνα 13. Βασικά δομικά χαρακτηριστικά φλαβονοειδούς ώστε να δρα αντιοξειδωτικά: (Α) κατεχολική δομή στον Β δακτύλιο. (Β) διπλός δεσμός στο δακτύλιο C (Γ) υδροξυλομάδες στις θέσεις 5 και 7 των δακτυλίων Α και C.

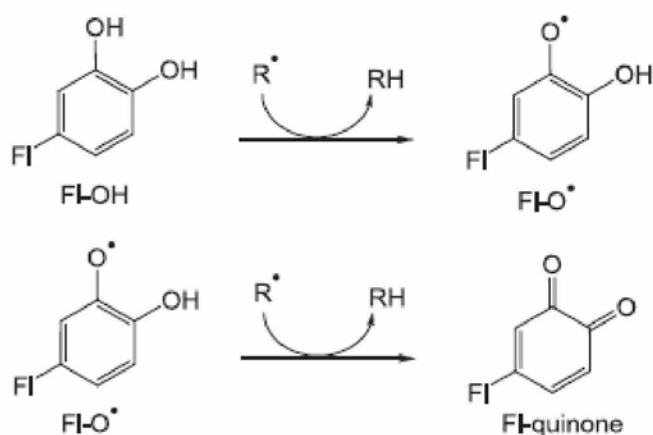
Η εξαιρετική τους ικανότητα να δεσμεύουν άμεσα μορφές οξυγόνου οφείλεται στην εγγενή τους δυνατότητα να δρουν ως ισχυροί δότες ηλεκτρονίων ή υδρογόνου. Το δυναμικό οξειδοαναγωγής των πολυφαινολών είναι χαμηλό, καθιστώντας τους δότες ηλεκτρονίων σε μόρια με υψηλότερο δυναμικό οξειδοαναγωγής, όπως για παράδειγμα είναι το υπεροξειδικό ανιόν  $O_2^{\bullet-}$ , η ρίζα υδροξυλίου  $\cdot OH$ , η ρίζα αλκυλίου  $RO\cdot$ . Οι πολυφαινολικές ενώσεις δρουν αντιοξειδωτικά τερματίζοντας αντιδράσεις ελευθέρων ριζών. Αποτελέσματα των

αντιδράσεων αυτών είναι η εκκαθάριση ελευθέρων ριζών (Valko et al., 2006; Kornika et al., 2009).



Όπου  $\text{R}^\bullet$  ελεύθερη ρίζα,  $\text{Ph-OH}$  φαινολικό μόριο (γενικά) και  $\text{Ph-O}^\bullet$  φαινοξυλική ρίζα.

Η ικανότητα αυτή δεν θα ήταν σημαντική εάν δεν εξασφαλιζόταν ότι η φαινοξυλική ρίζα μπορεί να σταθεροποιηθεί με κάποιον τρόπο ώστε να μην ξεκινήσει έναν καινούργιο οξειδωτικό μηχανισμό. Η φαινοξυλική ρίζα, ή ημικινόνη, είναι σχετικά δραστική (αν και δεν συντηρεί επί μακρόν τη δημιουργία ελευθέρων ριζών) και αντιδρά με δεύτερη ελεύθερη ρίζα για να αποκτήσει σταθερή δομή κίνησης (Kornika et al., 2009; Prochazkova et al., 2011). Παραστατικά η εκκαθάριση των ελευθέρων ριζών από ένα φλαβονοειδές δίνεται παρακάτω (Εικόνα 14):

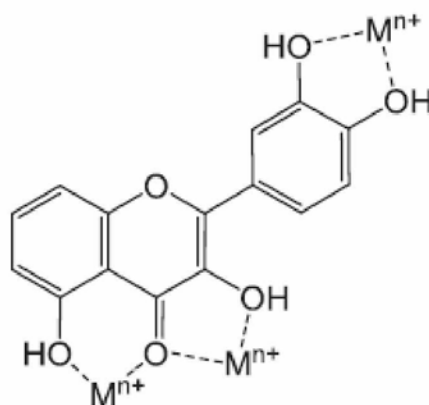


Εικόνα 14. Εκκαθάριση ελευθέρων ριζών ( $\text{R}^\bullet$ ) από ένα φλαβονοειδές. Η ημικινόνη  $\text{FI-O}^\bullet$  αντιδρά με τη δεύτερη ρίζα αποκτώντας τη σταθερή δομή κίνησης.

Επιπρόσθετα, τα φλαβονοειδή έχουν την ικανότητα χηλικοποίησης μεταβατικών μετάλλων, κυρίως σιδήρου και χαλκού, απομακρύνοντας με αυτόν τον



τρόπο έναν από τους αιτιώδεις παράγοντες δημιουργίας ελευθέρων ριζών (αντίδραση Fenton) (Blokchina et al., 2003; Prochazkova et al., 2011). Στην Εικόνα 15 παρουσιάζονται οι θέσεις στις οποίες προσδένονται τα μεταβατικά μέταλλα, στον δακτύλιο B η κατεχολική δομή, στον δακτύλιο C η υδροξυλομάδα στη θέση 3 και το οξυγόνο στη θέση 4 και τέλος ανάμεσα στο οξυγόνο του δακτυλίου C και της υδροξυλομάδας στη θέση 5 του δακτυλίου A (Prochazkova et al., 2011).



Εικόνα 15. Θέσεις σύνδεσης μεταβατικών μετάλλων ( $Mn^{n+}$ ) στη δομή φλαβονοειδούς

Επιπλέον τα φλαβονοειδή έχουν την ικανότητα να εμποδίζουν την υπεροξειδωση των λιπιδίων και να αναστείλουν τη χαλάρωση και διαπερατότητα των μεμβρανών που προκαλείται λόγω της υπεροξειδωσης. Έτσι μπορούν να περιορίσουν την έκταση των αντιδράσεων υπεροξειδωσης (Hirano et al., 2001; Blokchina et al., 2006).

Η αντιφλεγμονώδης, αντικαρκινική, ανοσολογική δράση αλλά και η προστασία που παρέχουν στις λειτουργίες της καρδιάς, του ήπατος και των νεύρων αποδίδεται στις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινόλων. Η εκκαθάριση του υπεροξειδικού ανιόντος από τις πολυφαινόλες έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της δημιουργίας του υπεροξυνιτριδίου μέσω του οποίου προκαλείται νιτρικό στρες το



οποίο ενοχοποιείται ότι παρέχει το χημικό υπόστρωμα για καρκινογένεση (Korkina et al., 2009; Prochazkova et al., 2011).

Κάτω από ορισμένες συνθήκες ωστόσο, για παράδειγμα υψηλή συγκέντρωση πολυφαινολικών αντιοξειδωτικών, παρουσία μεταβατικών μετάλλων (σιδήρου, χαλκού), υψηλό pH, μπορούν να δράσουν ως προ-οξειδωτικά. Τη βιολογική, αντιοξειδωτική ή προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινολών (τόσο σε επίπεδο κυττάρου όσο και σε επίπεδο οργανισμού) καθορίζουν η θέση των υποκαταστάσεων καθώς και ο αριθμός των υδροξυλομάδων. Οι παράγοντες αυτοί καθορίζουν εάν η ένωση θα δράσει αντιοξειδωτικά και ως ρυθμιστής της ενζυμικής δραστηριότητας ή εάν θα εκφράσει κυτταροτοξικές ιδιότητες. Φλαβονοειδή με περισσότερες υδροξυλομάδες παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική δράση (Valko et al., 2006; Prochazkova et al., 2011).

### **3.3. Προ-οξειδωτική δράση πολυφαινολών**

Σκοπός ενός «δικτύου αντιοξειδωτικής άμυνας» δεν είναι να εξαλείψει όλες τις ελεύθερες ρίζες και τις δραστικές μορφές οξυγόνου σε ένα βιολογικό σύστημα αλλά να ελέγξει τα επίπεδά τους επιτρέποντας τη διατήρηση των φυσιολογικών μεταβολικών διεργασιών του συστήματος, μειώνοντας παράλληλα την οξειδωτική φθορά (Halliwell, 2008). Τα αντιοξειδωτικά γενικά, και οι πολυφαινόλες ειδικότερα, ενεργοποιούν αντιδράσεις ανακύκλωσης των ελευθέρων ριζών εμποδίζοντας την οξειδωτική τους δράση. Πέραν όμως της ωφέλιμης για τα βιολογικά συστήματα δράσης τους υπάρχει πληθώρα ενδείξεων και αντίστοιχες μελέτες στις οποίες επισημαίνεται η καταστροφική / προ-οξειδωτική δράση των αντιοξειδωτικών γενικότερα αλλά και των πολυφαινολών ειδικότερα (Skibola and Smith, 2000). Ημικινόνες ή άλλα υποπροϊόντα της αυτοοξείδωσης των πολυφαινολών μπορεί να

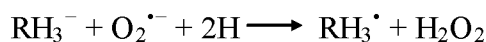
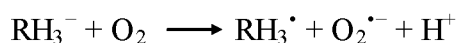
αλληλεπιδράσουν με βιομόρια ενεργοποιώντας αντιδράσεις λιπιδικής υπεροξειδωσης, οξειδωσης πρωτεϊνών και DNA και μείωσης των ενδογενών αντιοξειδωτικών. Οι αντιδράσεις αυτές τελικά οδηγούν σε καταστροφή κυτταρικών μεμβρανών, σε αλλαγές στην έκφραση γονιδίων και ενζύμων και στη σύνθεση του εξωκυττάριου χώρου. Τα φαινόμενα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα αλλαγές στον κυτταρικό κύκλο, ανώμαλες κυτταρικές λειτουργίες και καταστροφή της δομής του ιστού (Korkina et al., 2009).

Η προ-οξειδωτική δράση θεωρείται ότι είναι ευθέως ανάλογη του αριθμού των υδροξυλομάδων στο μόριο του φλαβονοειδούς. Έχει αποδειχθεί ότι πολλαπλές υδροξυλομάδες, τουλάχιστον 3, κυρίως στον Β δακτύλιο αυξάνουν σημαντικά την παραγωγή ριζών υδροξυλίου μέσω αντίδρασης Fenton (Heim et al., 2002; Hanasaki et al., 1994). Στην πραγματικότητα φαίνεται πως τα δομικά χαρακτηριστικά των φλαβονοειδών που είναι υπεύθυνα για την αντιοξειδωτική τους ικανότητα είναι ταυτόχρονα υπεύθυνα και για την προ-οξειδωτική τους δράση. Για παράδειγμα τα φλαβονοειδή προκαλούν την αναγωγή του Cu(I) σε Cu(II) οδηγώντας στη δημιουργία πρόδρομων ελευθέρων ριζών (Prochazkova et al., 2011).

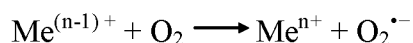
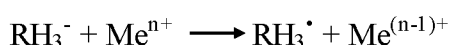
Η προ-οξειδωτική δράση των πολυφαινόλων, των φλαβονοειδών ειδικότερα, είναι ανάλογη της συγκέντρωσής τους (Yen et al., 2003; Laughton et al., 1989; Wilms et al., 2008). Μετρήσεις παραγωγής ελευθέρων ριζών μετά από αύξηση της συγκέντρωσης των φλαβονοειδών αποδεικνύουν την σχέση αυτή (Prochazkova et al., 2011).

Παρουσία μοριακού οξυγόνου, πολυφαινόλες με χαμηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής μπορούν να οξειδωθούν μέσω αυτοοξειδωσης, ακολουθώντας μια αλληλουχία αντιδράσεων ελευθέρων ριζών (Korkina et al., 2009).

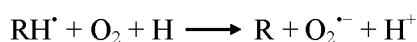
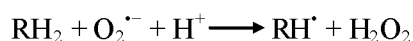
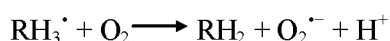
Αρχικά η πολυφαινολική ένωση οξειδώνεται παράγοντας ρίζα ημικινόνης:



Μέταλλα μετάπτωσης καταλύουν την πρώτη αντίδραση της πορείας αυτοοξειδωσης των πολυφαινολών:



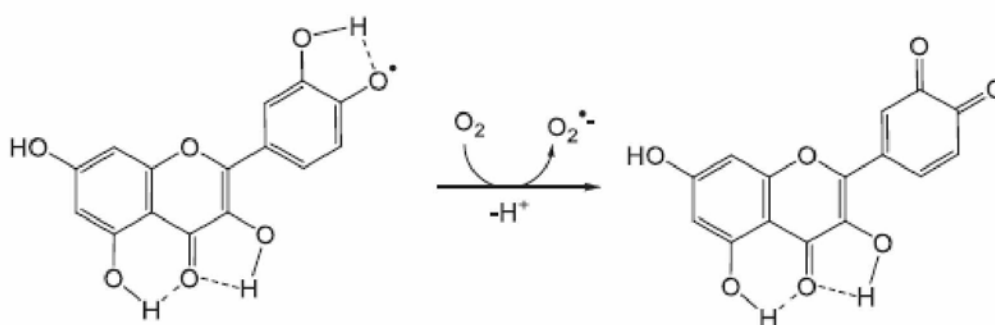
Πρωτογενείς ημικινόνες ή ρίζες φαινοξυλίου μπορούν επίσης να παραχθούν ενζυμικά, μέσω αντιδράσεων των πολυφαινολών με το  $\text{H}_2\text{O}_2$  ή με το κυτόχρωμα P-450. Μόλις σχηματιστούν οι πρωτογενείς ημικινόνες εμπλέκονται σε αλυσιδωτές αντιδράσεις μετατροπής της πολυφαινολικής ένωσης σε κινόνη:



Ενδιάμεσα προϊόντα και παραπροϊόντα της αυτοοξειδωσης των πολυφαινολών μπορεί να αλληλεπιδράσουν με βιομόρια προκαλώντας λιπιδική υπεροξειδωση, οξείδωση πρωτεϊνών και DNA καθώς και μείωση των ενδογενών αντιοξειδωτικών. Οι αντιδράσεις αυτές οδηγούν σε μη αναστρέψιμη βλάβη στις μεμβράνες, αλλαγή στη λειτουργία ενζύμων και των υποδοχέων τους καθώς και σε μεταλλάξεις, με αποτέλεσμα αλλαγή στις κυτταρικές λειτουργίες μέχρι και κυτταρικό

θάνατο. Για παράδειγμα φαινοξυλικές ρίζες μπορούν να οξειδώσουν τη γλουταθειόνη ή το NADH οδηγώντας στη δημιουργία ακόμα περισσότερων δραστικών μορφών οξυγόνου. Αντίθετα, σταθεροποιημένες κινόνες και ελεύθερες ρίζες με μικρό χρόνο ημιζωής, που αποτελούν παραπροϊόντα της αυτοοξείδωσης των πολυφαινολών, δρουν ως αντικαρκινικοί παράγοντες (Korkina et al., 2009).

Οι φαινοξυλικές ρίζες, FI-O<sup>•</sup>, τελικά προϊόντα των αντιδράσεων εκκαθάρισης ελευθέρων ριζών από τα φλαβονοειδή, έχουν χρόνο ημιζωής 200μs, είναι δραστικές, υποκείμενες σε περαιτέρω οξείδωση, οδηγώντας ανάμεσα σε άλλα και στις πιο σταθερές κινόνες. Μολονότι οι κινόνες είναι δραστικές εξουδετερώνονται καθώς συνδέονται σε μόρια όπως η γλουταθειόνη και η κυστεΐνη των πρωτεϊνών. Παρουσία μεταβατικών μετάλλων οι φαινοξυλικές ρίζες μπορούν να αντιδράσουν με το οξυγόνο παράγοντας ρίζα υπεροξειδικού ανιόντος και κινόνη, αντίδραση στην οποία οφείλεται η προ-οξειδωτική δράση των φλαβονοειδών (Εικόνα 16) (Prochazkova et al., 2011):



Εικόνα 16: Προ-οξειδωτική δράση φλαβονοειδών

Οι αντιοξειδωτικές ή προ-οξειδωτικές ιδιότητες των πολυφαινολών εξαρτώνται κυρίως από τη συγκέντρωσή τους. Επιπλέον η χημική δομή, οι χημικές ιδιότητες και οι οξειδοαναγωγικές ιδιότητες του περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται

καθορίζουν το αν θα δράσουν αντιοξειδωτικά, εξουδετερώνοντας ελεύθερες ρίζες, ή προ-οξειδωτικά, ενεργοποιώντας την παραγωγή τους. Την ιδιότητα των πολυφαινόλων να δρουν προ-οξειδωτικά αξιοποιεί μια καινούργια τάση που διέπει τις αντικαρκινικές θεραπείες. Η ιδέα αυτή αφορά το σχεδιασμό και τη χρήση φαινολικών προϊόντων για να ευαισθητοποιήσουν τον καρκινικό όγκο στις θεραπείες, με στόχο τη μείωση της δόσης του δραστικού (και τοξικού συνήθως) φαρμάκου. Παράλληλα υπάρχουν αναφορές ότι οι πολυφαινόλες δρουν κυτταροτοξικά στα καρκινικά κύτταρα αλλά και στο αγγειακό δίκτυο που τροφοδοτεί τον καρκινικό όγκο, γεγονός που συμβάλει στην κατεύθυνση αυτή (Korkina et al., 2009; Prochazkova et al., 2011).

#### **4. ΣΤΑΦΥΛΙΑ**

Τα σταφύλια αποτελούν τον καρπό της αμπέλου που χρησιμοποιείται από την ανθρωπότητα για βρώση ή για την παραγωγή κρασιού εδώ και αιώνες. Είναι γνωστό ως καρπός από την αρχαιότητα και αναφέρεται και στη Βίβλο. Τα σταφύλια έχουν μακρά ιστορία στην ανθρωπότητα, καθώς τόσο οι αρχαίοι Έλληνες όσο και οι Ρωμαίοι τα χρησιμοποιούσαν στην παραγωγή οίνου. Η συστηματική καλλιέργεια του σταφυλιού άρχισε 6.000-8.000 χρόνια πριν στην Εγγύς Ανατολή (Lacombe et al., 2006).

Το αμπέλι που αλλιώς ονομάζεται και κλήμα (*Vitis Vinifera*), είναι αναρριχητικό φυτό που μπορεί να φτάσει σε ύψος τα 16 έως 20 m, αν αφεθεί ακλάδευτο ενώ τα άνθη του είναι ερμαφρόδιτα (βοτρυώδεις ταξιανθίες). Προϊόντα του είναι ο μούστος, το κρασί, το ξύδι και οι σταφίδες, ενώ μπορεί να γίνει και γλυκό του κουταλιού. Υπάρχουν διάφορες ποικιλίες σταφυλιού, οι οποίες είναι δυνατόν να

διαθέτουν χρώματα όπως κόκκινο, κίτρινο, αλλά και μαύρο (σκούρο κόκκινο). Παρόλα αυτά, όλες ανεξαιρέτως οι ποικιλίες διαθέτουν εξίσου ωφέλιμες ουσίες.

Αν και έχουν γίνει σημαντικές προσπάθειες για την εύρεση της ακριβούς σύστασης των σταφυλιών και του κρασιού, αυτή δεν έχει καταστεί πλήρως γνωστή. Συγκεκριμένα, έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 500 χημικές ουσίες, εκ των οποίων οι 150 ανήκουν στην κατηγορία των εστέρων. Ακόμα, μεταξύ αυτών των συστατικών συγκαταλέγονται το νερό, τα σάκχαρα, τα οργανικά οξέα, αμινοξέα και διάφορες αρωματικές ενώσεις. Εδώ πρέπει να αναφερθεί το γεγονός ότι η συγκέντρωση του νερού εντός του καρπού διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον καθορισμό των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών καθώς είναι πλούσια σε Βιταμίνες Α, Β και C (Kosheleva and Kodentsova, 2013). Η πλειοψηφία των ενώσεων, βρίσκεται σε συγκεντρώσεις με εύρος  $10^{-1}$ - $10^{-6}$  mg/lit ενώ υπάρχουν ορισμένες σε συγκέντρωση  $>100$ mg/lit οι οποίες καθορίζουν τη γεύση και το άρωμα των σταφυλιών. Επίσης, περιέχουν κάλιο και άλλα ιχνοστοιχεία ενώ η ενεργειακή τους απόδοση υπολογίζεται κοντά στις 70 θερμίδες ανά 100 gr μάζας (10-12 ρόγες) που προέρχονται κυρίως από σάκχαρα.

Η σημαντικότερη όμως κατηγορία χημικών ενώσεων που συναντάται στα σταφύλια και το κρασί ιδιαίτερα όσον αφορά τη βιολογική τους δράση είναι οι φυτικές πολυφαινόλες (Jackson, 1993). Η κυριότερη πολυφαινόλη που βρίσκεται στη φλούδα του σταφυλιού, η ρεσβερατρόλη, έχει αντιοξειδωτική αλλά και αντικαρκινική δράση. Στα σταφύλια ανιχνεύονται πολλές χημικές ενώσεις που φαίνεται πως βοηθούν στην προαγωγή της υγείας (Howes and Simmonds, 2015; Yang and Xiao, 2013). Οι φαινολικές αυτές ενώσεις περιλαμβάνουν κυρίως τις ανθοκυανίνες, τα φλαβονοειδή, τα στιλβένια (ρεσβερατρόλη) και τα φαινολικά οξέα. Οι ανθοκυανίνες

είναι χρωστικές ουσίες, και υπάρχουν κυρίως στη φλούδα των σταφυλιών, είναι υπεύθυνες για το χρώμα των φρούτων και είναι οι σημαντικότερες φαινολικές ενώσεις στο σπόρο και τη φλούδα των σταφυλιών. Η σάρκα δεν περιέχει ανθοκυανίνες. Τα φλαβονοειδή (π.χ. προ-ανθοκυανίνες) απαντώνται ευρέως στα σταφύλια και ειδικά στις ρόγες σταφυλιού και στους μίσχους. Η ποσότητα, η δομή, και ο βαθμός πολυμερισμού των προ-ανθοκυανινών των σταφυλιών διαφέρει και εξαρτάται κυρίως από τον ιστό του σταφυλιού. Στα σταφύλια τα πολυφαινολικά οξέα αποθηκεύονται κυρίως στα χυμοτόπια των κυττάρων (Xia et al., 2010).

Τα φλαβονοειδή που συναντώνται στα σταφύλια είναι κυρίως οι φλαβονόλες, οι φλαβανόλες (κατεχίνες), οι ανθοκυανίνες και οι φλαβαν-3,4-διόλες (λευκοανθοκυανίνες) που είναι παράγωγα των ανθοκυανινών (Flamini et al., 2013). Οι φλαβονόλες και οι ανθοκυανίνες βρίσκονται κυρίως στη φλούδα ενώ οι κατεχίνες και οι λευκοανθοκυανίνες βρίσκονται κυρίως στα σπέρματα και στο μίσχο των σταφυλιών. Οι προκυανιδίνες υπάρχουν κυρίως ως διμερή στα σταφύλια ενώ στο κρασί πολυμερίζονται επιπλέον και σχηματίζουν τις συμπυκνωμένες ταννίνες. Οι πολυμερείς αυτές ενώσεις σχηματίζουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες της σιέλου, στα οποία οφείλεται η στυπτικότητα στη γεύση των σταφυλιών και του κρασιού. Το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο των σταφυλιών διαφοροποιείται ανάλογα με την ποικιλία, την εδαφολογική σύνθεση, το κλίμα, τη γεωγραφική προέλευση, τις μεθόδους καλλιέργειας και πιθανές ασθένειες (Xia et al., 2010).

Αναλυτικότερα, όσον αφορά τις ευεργετικές επιδράσεις του σταφυλιού, συντελεί στη διούρηση και στην αποβολή τοξινών (Moura et al., 2014). Η συγκεκριμένη δράση οφείλεται κατά κύριο λόγο στο κάλιο που περιέχεται στον καρπό. Μάλιστα, οι αποτοξινωτικές ιδιότητες του σταφυλιού είναι γνωστές από

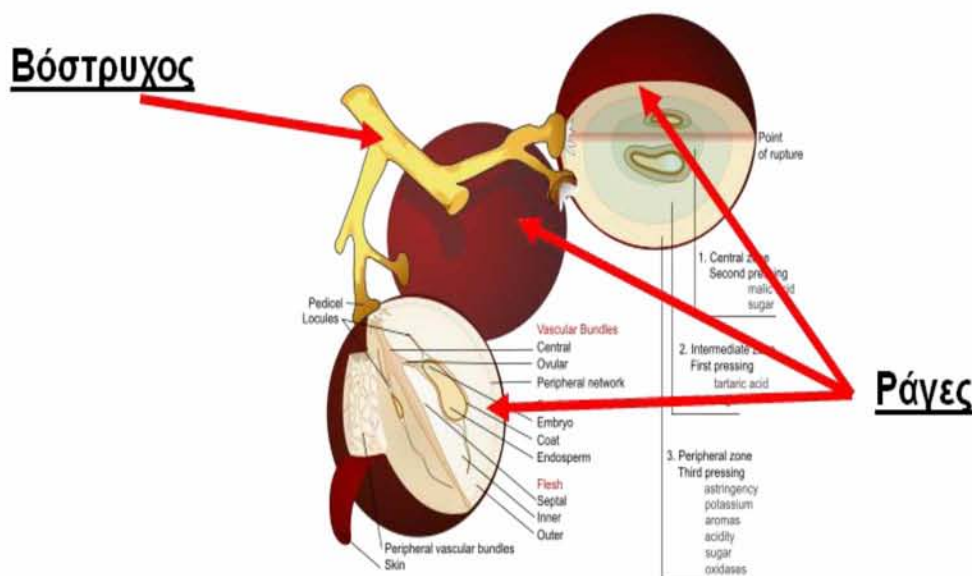
αρχαιοτάτων χρόνων. Στην αρχαία Ελλάδα, οι Έλληνες εφάρμοζαν την σταφυλοθεραπεία, η οποία περιελάμβανε μονοφαγία σταφυλιού για σύντομο χρονικό διάστημα από μια βδομάδα έως ένα μήνα. Όμως, εκτός από την αρχαιότητα, ένα κλασσικό παράδειγμα της σύγχρονης εποχής που καταδεικνύει την ευεργετική επίδραση του σταφυλιού είναι το λεγόμενο « Γαλλικό παράδοξο». Σύμφωνα λοιπόν με αυτό, οι Γάλλοι εμφανίζουν μειωμένη συχνότητα καρδιοπαθειών, παρόλο που καταναλώνουν μεγάλα γεύματα με τροφές πλούσιες σε λιπαρά. Σύμφωνα με τους Renaud και de Lorgeril (1992), οι ποσότητες κρασιού που καταναλώνουν οι Γάλλοι, βοηθούν στην αποφυγή εμφάνισης τέτοιων παθήσεων.

#### **4.1. Ανατομία Σταφυλιών**

Το σταφύλι είναι ο καρπός της αμπέλου. Η άμπελος αλλιώς ονομάζεται και κλήμα (*Vitis vinifera*) και είναι αναρριχητικό φυτό. Το σταφύλι απαρτίζεται από το ξυλώδες μέρος, που ονομάζεται βόστρυχος ή τσαμπί και τις ράγες, που αποτελούν το εδώδιμο και οινοποιήσιμο τμήμα του σταφυλιού. Οι βόστρυχοι έχουν διπλό φυσιολογικό ρόλο, καθώς κρατάνε τις ράγες και μεταφέρουν τις θρεπτικές ουσίες στους καρπούς. Το βάρος τους συνήθως αποτελεί το 4% του συνολικού βάρους του σταφυλιού. Οι ράγες αποτελούνται από τα γίγαρτα (κουκούτσια), το φλοιό και τη σάρκα και καταλαμβάνουν περίπου το 96% του συνολικού βάρους του σταφυλιού. Τα στέμφυλα είναι το υπόλειμμα που μένει μετά την έκθλιψη των σταφυλιών και αποτελείται από τους βοστρύχους (κοτσάνια), τα γίγαρτα (κουκούτσια) και τους φλοιούς των σταφυλιών, ενώ περικλείει και κάποιο ποσοστό γλεύκους (αζύμωτου ή εν ζυμώσει) ή κρασιού ανάλογα με το βαθμό έκθλιψης / πίεσης τους. Η επί της εκατό αναλογία των δυο αυτών μερών του σταφυλιού δεν είναι σταθερή, αλλά εξαρτάται από την ποικιλία αυτού, τις κλιματολογικές συνθήκες, το έδαφος, την ηλικία των



πρεμνών, το χρόνο του τρυγητού, την προσβολή από διάφορες ασθένειες και γενικά από κάθε παράγοντα που θα επηρέαζε το μέγεθος του βόστρυχα. Γενικά όσο μεγαλύτερος είναι ο βότρυς, τόσο μικρότερος είναι ο βόστρυχας σε σχέση με το σύνολο των ραγών.



Εικόνα 17. Ανατομία και σύσταση ράγας σταφυλιού

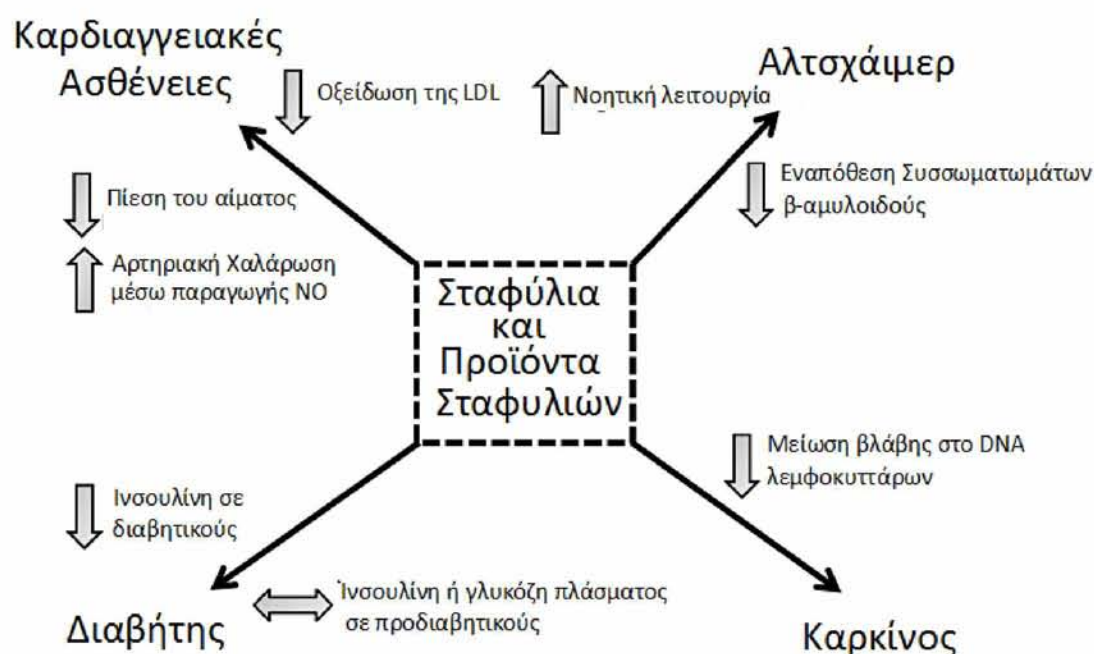
#### 4.2. Τα Σταφύλια Και Οι Βιολογικές Τους Ιδιότητες

Οι πολυφαινόλες είναι τα πιο σημαντικά συστατικά βιοδραστικά συστατικά που εμπεριέχονται στο σταφύλι, διότι διαθέτουν πολλές βιολογικές ιδιότητες και προάγουν πολλά οφέλη στην υγεία. Οι πολυφαινόλες των σταφυλιών έχουν άμεση συσχέτιση με το «Γαλλικό παράδοξο». Πιο συγκεκριμένα, τα σταφύλια έχουν αξιοσημείωτη αντιοξειδωτική ικανότητα, καθώς εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες, αναστέλλουν τη λιπιδική υπεροξείδωση και μειώνουν το σχηματισμό υδροϋπεροξειδίων (Shanmuganayagam et al., 2007). Επιπρόσθετα, διαθέτουν καρδιοπροστατευτική δράση η οποία οφείλεται στην αντιθηρωματική τους δράση

(εμποδίζουν το σχηματισμό αθηρωματικής πλάκας) μέσω της βελτίωσης της λειτουργίας του ενδοθηλίου, της αύξησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας του ορού και κατ'επέκταση της μείωσης της οξείδωσης της LDL και της ελάττωσης της συσσωμάτωσης των αιμοπεταλίων (Vislocky and Fernandez, 2010; Keevil et al., 2000; Xia et al., 2010). Περαιτέρω έρευνες απέδειξαν, ακόμη, τις ευεργετικές τους επιδράσεις στις χρόνιες εκφυλιστικές ασθένειες (Alzheimer), στο διαβήτη, στη γήρανση, στην αντική δραστηριότητα και στη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος (Vislocky and Fernandez, 2010). Άλλες βιολογικές ιδιότητες των σταφυλίων και του κρασιού αναφέρονται σε μελέτες που έδειξαν σημαντική αντιφλεγμονώδη επίδραση των πολυφαινολικών συστατικών τους σε ποντίκια και ανθρώπους, φανερώνοντας έτσι την θετική τους επίδραση στην παχυσαρκία και στον σακχαρώδη διαβήτη (Chacon et al., 2009; Terra et al., 2009), καθώς και αντιμυκητιακή δραστηριότητα (Jung et al., 2005), αντιβακτηριακή δραστηριότητα (Baydar et al., 2006), δράση κατά του έλκους και δράση κατά της υπέρτασης (Soares De Moura et al., 2002).

Τέλος, μια από τις πιο σημαντικές πολυφαινόλες των σταφυλίων είναι η ρεσβερατρόλη, διότι φαίνεται να παρουσιάζει χημειοπροστατευτική καρκινική δραστηριότητα (Kaur et al., 2009), κάτι το οποίο προσδιορίστηκε σε δοκιμασίες πάνω στα τρία στάδια της καρκινογένεσης. Οι μηχανισμοί μέσω των οποίων αποδεικνύεται η αντικαρκινική της δράση είναι: η αναστολή των κυκλοοξυγενασών (COX-1, COX-2), η αναστολή της υδροϋπεροξειδικής λειτουργίας, η αντιμεταλλαξιγόνος δράση της και η επαγωγή των ενζύμων της φάσης II του μεταβολισμού των φαρμάκων. Επίσης, βρέθηκε να επάγει τη διαφοροποίηση των ανθρώπινων προμυελωτικών λευχαιμικών κυττάρων, να αναστέλλει την ανάπτυξη προνεοπλαστικών βλαβών σε ποντίκια με καρκίνο του μαστού και να αναστέλλει την ογκογένεση σε ποντίκια με καρκίνο του

δέρματος (Jang et al., 1997). Γενικώς, φαίνεται ότι τα σταφύλια μπορούν να ασκήσουν αντικαρκινική δράση μέσω διακοπής της κυτταρικής αύξησης, τροποποιώντας βιοχημικά μονοπάτια μεταγωγής σήματος που ρυθμίζουν τον κυτταρικό κύκλο. Ακόμα, όμως, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες, ώστε να διευκρινιστούν οι μηχανισμοί μέσω των οποίων ασκούν τη χημειοπροστατευτική τους δράση (DeFlora & Ramel, 1990).



Εικόνα 18. Βιολογικές ιδιότητες των σταφυλιών

#### 4.3. Εκχυλίσματα Σταφυλιού

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον για τις φαινολικές ενώσεις, που περιέχονται στα σταφύλια, ολοένα και αυξάνει. Γεγονός που εστιάζεται στις βιολογικές ιδιότητες (αντιοξειδωτικές, καρδιοπροστατευτικές, αντικαρκινικές, αντιφλεγμονώδεις, αντιγηραντικές και αντιμικροβιακές) που συνδέουν τις φαινολικές ενώσεις με τα πιθανά οφέλη για την υγεία του ανθρώπου. Έχει μελετηθεί ευρέως και

σε μεγάλο βαθμό η βιοδραστικότητα των φαινολικών ενώσεων όσον αφορά τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες (δηλαδή τη δέσμευση των ελευθέρων ριζών, την παρεμπόδιση της οξείδωσης των λιπιδίων και την παρεμπόδιση δημιουργίας υπεροξειδίων). Χαρακτηριστικά, ο χυμός του σταφυλιού ασκεί προστατευτική δράση έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων. Επιπλέον τα εκχυλίσματα σταφυλιού προστατεύουν τις κυτταρικές μεμβράνες από το οξειδωτικό στρες (En-Qin Xia, 2010; Sharma et al., 2007).

Τα εκχυλίσματα σταφυλιών έχουν μελετηθεί ευρέως λόγω των πιθανών ευεργετικών τους επιδράσεων στην ανθρώπινη υγεία. Ωστόσο, υπάρχουν μόνο λίγες μελέτες που να αφορούν τις θετικές επιδράσεις των εκχυλισμάτων από τα επιμέρους στελέχη του σταφυλιού. Πολλά εκχυλίσματα βοστρύχων σταφυλιού μπορούν και αναστέλλουν την επιζήμια δράση των OH<sup>-</sup> και ROO<sup>-</sup> στο DNA (Stagos et al., 2005).

Το επίκεντρο του ενδιαφέροντος μετατοπίστηκε στη διερεύνηση της πιθανής χημειοπροστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων από σταφύλια, λόγω του υψηλού αντιοξειδωτικού περιεχομένου τους. Σε παλαιότερα πειράματα σε μια σειρά από *in vitro* και *in vivo* μελέτες σε διάφορες ελληνικές ποικιλίες σταφυλιών διερευνήθηκε η δραστηριότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στη ρύθμιση του οξειδωτικού στρες, δηλαδή της οξειδάσης της ξανθίνης (XO), της καταλάσης (CAT) και της δισμουτάσης του υπεροξειδίου (SOD). Τα αποτελέσματα έδειξαν την ύπαρξη αντιοξειδωτικής δράσης της SOD ενώ η XO και η CAT φαίνεται ότι λειτουργούν ως προ-οξειδωτικά. Τα εκχυλίσματα φάνηκε να ασκούν προ-οξειδωτική δράση η οποία πιθανώς να εξαρτάται τόσο από τη σύνθεση όσο και από τη συγκέντρωση πολυφαινολικών συστατικών που περιέχουν (Spanou et al., 2011).

Τα τελευταία χρόνια μελέτες έχουν υποστηρίξει την αντικαρκινική δράση των εκχυλισμάτων σταφυλίων έναντι διαφόρων τύπων καρκίνου, όπως ο καρκίνος του μαστού, του πνεύμονα και του στομάχου. Αυτή η ιδιότητα οφείλεται κυρίως στις φυτικές πολυφαινόλες που εντοπίζονται στα σταφύλια. Οι πολυφαινόλες οι οποίες απαντώνται σε αφθονία στα εκχυλίσματα ελληνικών ποικιλιών σταφυλιού, ήταν ισχυροί αναστολείς της τοποϊσομεράσης I, (που δείχνει ότι η αναστολή αυτού του ενζύμου μπορεί να αποτελεί ένα μηχανισμό για την αντικαρκινική δράση των ενώσεων αυτών). Επιπλέον, τα εκχυλίσματα σταφυλιού ανέστειλαν τη μιτομυκίνη C (αναστέλλει τη διαίρεση του DNA με το σχηματισμό συμπλόκου με αυτό, ασκώντας έτσι αντικαρκινική δράση), γεγονός που υποδηλώνει ότι θα μπορούσαν να εμποδίζουν βλάβες από τις ROS στο DNA. Ωστόσο, απομονωμένες φυτικές πολυφαινόλες ενισχύουν τη μιτομυκίνη C που δρα ως προοξειδωτικό (Stagos et al, 2005).

Επίσης, *in vivo* και *in vitro* μελέτες απέδειξαν ότι τα εκχυλίσματα σταφυλίων μπορούν να δράσουν αποτρέποντας την εξέλιξη της καρκινογένεσης. Η αντι-μεταλλαξιγόνος δράση των εκχυλισμάτων από τις ελληνικές ποικιλίες σταφυλίων του είδους *Vitis vinifera* εκτιμήθηκε ως ένας πιθανός χημειοπροστατευτικός μηχανισμός, ενάντια στις επιζήμιες βλάβες στο DNA. Οι δύο τοπικές ελληνικές ποικιλίες σταφυλίων ήταν Ασύρτικο και Μανδηλαριά, ενώ οι οξειδωτικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η μπλεομυκίνη (BLM) και το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ). Τα εκχυλίσματα έδειξαν να έχουν ανασταλτική δραστηριότητα έναντι των δύο μεταλλαξιγόνων. Αυτά τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι η προστασία του DNA από μεταλλάξεις που προκαλούνται από ROS μπορεί να περιλαμβάνονται στους μηχανισμούς χημειοπροστατευτικής δράσης των εκχυλισμάτων σταφυλίων. Ωστόσο,

φαίνεται ότι αυτή η προστατευτική δράση δε μπορεί να αποδοθεί στις πολυφαινόλες, αλλά μάλλον στη συνέργεια πολλών ενώσεων που περιέχονται στα σταφύλια (Stagos et al., 2006). Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να επισημανθεί το ευρύτερο νόημα της έννοιας της χημειοπροφύλαξης, η οποία είναι συνιστώσα πολλών παραγόντων που αφορούν και στοχεύουν κυρίως στην πρόληψη με σκοπό την παρεμπόδιση εμφάνισης εκφυλιστικών παθήσεων (Stagos et al, 2005).

Το εκχύλισμα γιγάρτων σταφυλιών περιέχει μια μεγάλη ποικιλία χρήσιμων ουσιών όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, υδατάνθρακες και πολυφαινόλες. Οι πολυφαινόλες αποτελούν το 8 με 9% του εκχυλίσματος των σπόρων και αυτό εξαρτάται από την ποικιλία. Οι πολυφαινόλες στους σπόρους των σταφυλιών βρίσκονται κυρίως υπό τη μορφή των βιοφλαβονοειδών. Τα φλαβονοειδή αυτά συμπεριλαμβάνουν παράγωγα των φλαβονοτριολών όπως, το γαλλικό οξύ, την κατεχίνη, την επικατεχίνη, την γαλλοκατεχίνη, την επιγαλοκατεχίνη, την προκυανιδίνη, την πολυμερισμένη, προακυανιδίνη και τις προανθοκυανιδίνες. Οι προανθοκυανιδίνες αναφέρονται ως ολιγομερείς (μονομερείς, διμερείς, τριμερείς κτλ) προανθοκυανιδίνες και με διεθνή συντομογραφία OPCs. Οι OPCs έχουν μεγαλύτερη αντιοξειδωτική ικανότητα από τις βιταμίνες E έως 50 φορές και έως 20 φορές από την βιταμίνη C. Τα κυριότερα βιοενεργά συστατικά του σταφυλιού είναι οι προανθοκυανιδίνες και η ρεσβερατρόλη (Bagchi et al., 2014).

## Σκοπός της έρευνας

Τα τελευταία είκοσι χρόνια αρκετά εκχυλίσματα σταφυλιών και άλλα προϊόντα των σταφυλιών όπως το κρασί ήταν στο επίκεντρο μελετών λόγω των ισχυρών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους. Έχειδειχθεί ότι τα αντιοξειδωτικά που προέρχονται από τα σταφύλια είναι ιδιαίτερα ισχυρά και μπορούν να ασκήσουν προστατευτική δράση έναντι διαφόρων ασθενειών όπως ο διαβήτης και τα καρδιαγγειακά νοσήματα. Ένα από τα κυριότερα ερωτήματα είναι κατά πόσο τα διάφορα εκχυλίσματα πλούσια σε πολυφαινόλες μπορούν να επηρεάσουν το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του κυττάρου και κατ' επέκταση ενός οργανισμού. Επίσης υπάρχει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για την μελέτη των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων μπορούν να πετύχουν την δράση τους. Σκοπός λοιπόν της διατριβής αυτής ήταν να ερευνηθούν οι επιδράσεις της χορήγησης εκχυλίσματος στεμφύλων σταφυλιού σε μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα, σε δείκτες οξειδωτικού στρες, στα επίπεδα και τη δραστηριότητα μιας σειράς αντιοξειδωτικών ενζύμων καθώς και στη γονιδιακή έκφραση των κυττάρων. Τα αποτελέσματα της έρευνας αναμένεται να βοηθήσουν στην κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων, αντιοξειδωτικά προερχόμενα από σταφύλια μπορούν να ασκήσουν αντιοξειδωτική δράση στα κύτταρα. Η κατανόηση των μηχανισμών αυτών θα μπορούσε να βοηθήσει στην σωστή χορήγηση αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων ειδικά σε ανθρώπους που πάσχουν από ασθένειες που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες. Πιο συγκεκριμένα, τα ερωτήματα/στόχοι της διατριβής συνοψίζονται παρακάτω:

1. Ένα εκχύλισμα στεμφύλων σταφυλιού με αποδεδειγμένη ισχυρή αντιοξειδωτική δράση *in vitro* είναι ικανό να ασκήσει προστατευτική - αντιοξειδωτική δράση σε μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα που εκτέθηκαν σε

οξειδωτικό παράγοντα; Αν ναι, μέσω ποιων κυτταρικών μοριακών μηχανισμών μπορεί να βελτιώσει την οξειδοαναγωγική κατάσταση μυϊκών και ενδοθηλιακών κυττάρων;

2. Η αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιού σε μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα εξαρτάται από την ποσοτική τους σύσταση σε πολυφαινόλες ή η ποιοτική τους σύσταση σε πολυφαινόλες παίζει σημαντικότερο ρόλο;
3. Το εκχύλισμα στεμφύλων σταφυλιού μπορεί να δράσει αντιοξειδωτικά επηρεάζοντας τους μηχανισμούς της γονιδιακής έκφρασης των μυϊκών κυττάρων. Αν ναι ποια γονίδια επηρεάζονται περισσότερο και ποιος είναι ο ρόλος τους;



## ***ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2***

***Επίδραση πολυφαινολικού εκχυλίσματος στεμφύλων  
σταφυλιού της ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου στο  
οξειδοαναγωγικό δυναμικό μυϊκών και ενδοθηλιακών  
κυττάρων***

## 2.1. Γενικά

Είναι γνωστό ότι κάθε ζωντανός οργανισμός εκτίθεται σε ελεύθερες ρίζες του οξυγόνου ( $O_2$ ) κάτω από διάφορες συνθήκες φυσιολογικές ή μη. Οι ελεύθερες ρίζες παράγονται υπό φυσιολογικές συνθήκες όπως ο αερόβιος μεταβολισμός και συμμετέχουν σε διάφορες λειτουργίες του κυττάρου ως ρυθμιστές μονοπατιών σηματοδότησης, στην γονιδιακή έκφραση, στη φυσιολογική απόπτωση και σε φυσιολογικές προσαρμογές κατά τη διάρκεια της άσκησης (Ji et al., 2007; Well et al., 2009; Ji et al., 2006; Gomez-Cabrera et al., 2005). Επιπλέον, οι ελεύθερες ρίζες μπορούν να παραχθούν υπό μη φυσιολογικές συνθήκες, όπως η "κακή" διατροφή, το κάπνισμα, η έκθεση σε ιονίζουσα και υπεριώδη ακτινοβολία (Baudet et al., 2012; Kelsen, 2012). Η υπερπαραγωγή ελεύθερων ριζών μπορεί να προκαλέσει οξειδωτική βλάβη σε βιολογικά μακρομόρια, στο ανοσοποιητικό σύστημα, και στον μυϊκό ιστό μπορεί να προκαλέσει οξειδωτική βλάβη και μυϊκό κάματο (Veskoukis et al., 2008; Schneider and Tiidus, 2007; Nikolaidis et al., 2007; Betters et al., 2004). Ωστόσο, κάθε ζωντανός οργανισμός διαθέτει αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς για την αντιμετώπιση της υπερπαραγωγής των ελευθέρων ριζών (Karpinska and Gromadzka, 2013). Οι αντιοξειδωτικοί προστατευτικοί μηχανισμοί ενεργούν για να διατηρηθεί μια ισορροπία μεταξύ της παραγωγής ελεύθερων ριζών και της εξουδετέρωσής τους. Η διαταραχή αυτής της ισορροπίας, οδηγεί στην εμφάνιση του οξειδωτικού στρες, μιας παθολογικής κατάστασης που ενδέχεται να οδηγήσει σε αρκετές νόσους (Poljsak and Milisav, 2012).

Το οξειδωτικό στρες εμφανίζεται συχνά στον μυϊκό ιστό έπειτα από την υπερβολική έκθεση σε δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS). Για παράδειγμα, κατά τη διάρκεια της οξείας και έντονης άσκησης υπάρχει υψηλό ποσοστό κατανάλωσης

οξυγόνου ( $O_2$ ) στους σκελετικούς μύες, που μπορεί να προκαλέσει ατελή αναγωγή του  $O_2$  σε νερό ( $H_2O$ ) και διαρροή ηλεκτρονίων από την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (αναπνευστική αλυσίδα) με αποτέλεσμα την παραγωγή των ROS που μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικό στρες. Τελικό αποτέλεσμα είναι η εμφάνιση μυϊκού καμάτου, κυτταρικών αλλοιώσεων και απόπτωσης (Phaneuf and Leeuwenburgh, 2001; McClung et al., 2010).

Επιπλέον, η βλάβη του αγγειακού ενδοθηλίου από το οξειδωτικό στρες μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες ασθένειες (Baghi et al., 2003). Όπως περιγράφεται από τον Kokura et al (1999) και τους Hazel και Muller (2001), μια οξειδοαναγωγική ανισορροπία σε ενδοθηλιακά κύτταρα έχει σαν αποτέλεσμα την έκφραση διαφορετικών σηματοδοτικών μορίων από τα ενδοθηλιακά κύτταρα, γεγονός που υποδηλώνει ότι το οξειδωτικό στρες επάγει οξείες και χρόνιες φάσεις προσκόλλησης των λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο. Λόγω των δυσμενών συνεπειών του οξειδωτικού στρες στην υγεία του ανθρώπου, έχει προταθεί ότι η χορήγηση αντιοξειδωτικών ουσιών μπορεί να προστατεύσει από την προβληματική αυτή κατάσταση (Kerasioti et al., 2012; Georgakouli et al., 2013). Έτσι, φυτικά τρόφιμα πλούσια σε αντιοξειδωτικά έχουν δείχθει ότι έχουν ευεργετικές επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία (Liu, 2013). Κατά τα τελευταία χρόνια, αρκετά εκχυλίσματα σταφυλιών και άλλα προϊόντα των σταφυλιών όπως το κρασί ήταν στο επίκεντρο μελετών λόγω των ισχυρών αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους. Η ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου Φυσιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας έχει δείξει ότι εκχυλίσματα σταφυλιού παρουσίασαν υψηλή αντιοξειδωτική δράση και παρεμπόδιζαν την επαγόμενη από ελεύθερες ρίζες (ROS) βλάβη στο DNA (Stagos et al., 2005; 2006; 2007). Οι αντιοξειδωτικές

επιδράσεις εκχυλισμάτων στεμφύλων από σταφύλια αποδίδονται κυρίως στην πλούσια πολυφαινολική τους σύσταση (Stagos et al., 2006; Apostolou et al., 2013).

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η ικανότητα ενός εκχυλίσματος στεμφύλων πλούσιο σε πολυφαινόλες να επηρεάσει την οξειδοαναγωγική κατάσταση των μυϊκών και ενδοθηλιακών κυττάρων τόσο απουσία όσο και παρουσία ενός παράγοντα πρόκλησης οξειδωτικού στρες. Η έρευνα για τις αντιοξειδωτικές επιδράσεις του εκχυλίσματος στεμφύλων σε κυτταρικό επίπεδο θα βοηθήσει την κατανόηση των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων ασκείται αυτή η δράση. Επειδή τα εν λόγω εκχυλίσματα τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται και ως συμπληρώματα διατροφής, η κατανόηση των επιπτώσεων της χορήγησής τους σε αυτά τα συστήματα είναι σημαντική. Η σύσταση του εδάφους καθώς και οι κλιματικές συνθήκες επηρεάζουν την φαινολική σύσταση των σταφυλιών, λόγω της επιρροής της στη βιοχημική σύνθεση αυτών των ενώσεων, και κατά συνέπεια η έρευνα για τις βιολογικές ιδιότητες των τοπικών ποικιλιών είναι επίσης σημαντική (Soleas et al., 1997).

### **2.1.1. Μυϊκά Κύτταρα C2C12**

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκαν μυϊκά κύτταρα της κυτταρικής σειράς μυοβλαστών ποντικού C2C12. Αυτά τα κύτταρα είναι ικανά να διαφοροποιούνται όταν καλλιεργούνται σε κατάλληλα θρεπτικά μέσα. Αποτελούν ένα χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της διαφοροποίησης των μυοβλαστών και οστεοβλαστών, στην έκφραση διάφορων πρωτεϊνών, και στην διερεύνηση βιοχημικών μονοπατιών. Η κυτταρική σειρά C2C12 είναι μια αθάνατη σειρά σκελετικών μυοβλαστών ποντικού, που αρχικά προέρχεται από δορυφορικά κύτταρα από το μυ του μηρού του ζώου 70 ώρες μετά από σοβαρούς τραυματισμούς (Yaffe

και Saxel, 1977). Αναπτύσσονται ως αδιαφοροποίητοι μυοβλάστες σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο.

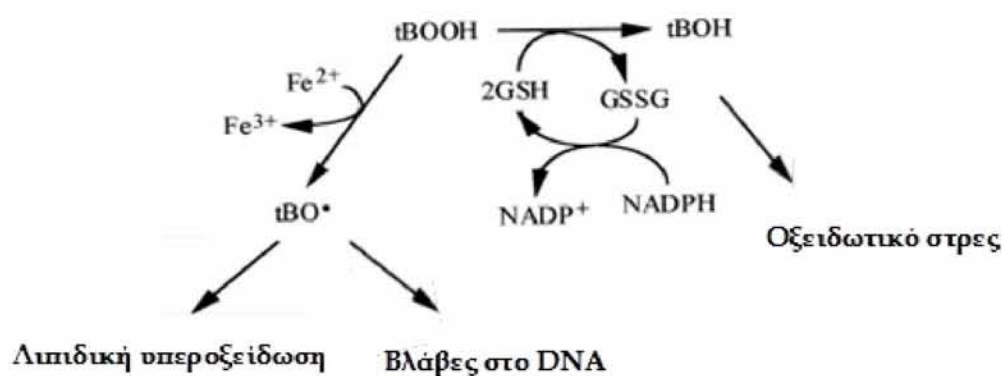
### **2.1.2. Ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926**

Τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 δημιουργήθηκαν με σύντηξη ανθρώπινων ενδοθηλιακών κυττάρων ομφάλιου φλέβας με καρκινικά κύτταρα ανθρώπου της σειράς A549. Τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 χρησιμοποιούνται σήμερα ως ένα *ex vivo* μοντέλο για την μελέτη διάφορων φυσιολογικών και παθολογικών διεργασιών, ειδικά στον τομέα της έρευνας της αγγειογένεσης (Emeis and Edgell, 1988).

### **2.1.3. Μηχανισμός δράσης του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP**

Ο οξειδωτικός παράγοντας τριτ-βούτυλ-υδροϋπεροξειδίο (t-BHP) είναι ένα οργανικό υδροπεροξειδίο. Εξαιτίας της δραστικής ομάδας του υδροπεροξειδίου μπορεί να παράγει ROS και να δράσει ως τοξικός παράγοντας σε κύτταρα. Έχει χρησιμοποιηθεί για την μελέτη των μηχανισμών μέσω των οποίων δρουν οι ελεύθερες ρίζες κυρίως σε ηπατικά κύτταρα (Sies and Summer, 1975; Alia et al., 2005). Ο κύριος μηχανισμός δράσης του t-BHP που έχει προταθεί παρουσιάζεται στην Εικόνα 19. Έχει παρατηρηθεί ότι ο οξειδωτικός παράγοντας t-BHP μπορεί να οξειδώσει την GSH, μέσω της δράσης της GPx και να οδηγήσει στην αύξηση της συγκέντρωσης της GSSG στα κύτταρα (Sies and Summer, 1975; Martín et al., 2000; Lima et al., 2006). Ακόμη αλληλεπιδρά με ιόντα τα  $Fe^{2+}$  οδηγώντας στο σχηματισμό των ριζών tBO• (Martín et al., 2000; Hix et al., 2000). Τόσο οι παραγόμενες ρίζες tBO• (*tert*-butyl-hydroperoxyl) όσο και η αλληλεπίδραση του t-BHP με την GSH, έχουν συνδεθεί με τη λιπιδική υπεροξείδωση (Alia et al., 2005; Lima et al., 2006) και

την πρόκληση βλαβών στο DNA (Εικόνα 19) (Martín et al., 2000; Latour et al., 1995).



Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης του οξειδωτικού παράγοντα τριτ-βούτυλ-υδροϋπεροξείδιο (t-BHP).

## 2.2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.2.1. Παρασκευή του εκχυλίσματος στεμφύλων σταφυλιού *Vitis vinifera* της ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου

Το εκχύλισμα προέκυψε από στέμφυλα σταφυλιών που ανήκουν στο είδος *Vitis vinifera* και συγκεκριμένα στην τοπική ποικιλία Μπατίκι Τυρνάβου (κόκκινα σταφύλια που καλλιεργούνται στην Κεντρική Ελλάδα). Η πρώτη ύλη ξεράθηκε σε ένα σκιερό και καλά αεριζόμενο μέρος, τοποθετήθηκε και εκχυλίστηκε με αιθανόλη (96%) στους 50 °C για 4 ώρες. Μετά από διήθηση, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό ελαττωμένη πίεση, και το υπόλειμμα κρατήθηκε στους -20 °C μέχρι τη στιγμή της ανάλυσης για τη διερεύνηση του πολυφαινολικού περιεχομένου του.

### 2.2.2. Καλλιέργεια των κυτταρικών σειρών C2C12 και EA.hy926

Στην συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Οι κυτταρικές σειρές που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη ήταν τα μυϊκά κύτταρα της σειράς C2C12 που αποτελούν μυοβλάστες ποντικού και τα αγγειακά-ενδοθηλιακά κύτταρα ανθρώπου της σειράς EA.hy926, που αποτελούν υβριδική σειρά που προέκυψε από τη σύντηξη ενδοθηλιακών κυττάρων ομφαλικής φλέβας ανθρώπου (HUVECs) και επιθηλιακών κυττάρων από καρκίνωμα πνεύμονα του ανθρώπου (A549).

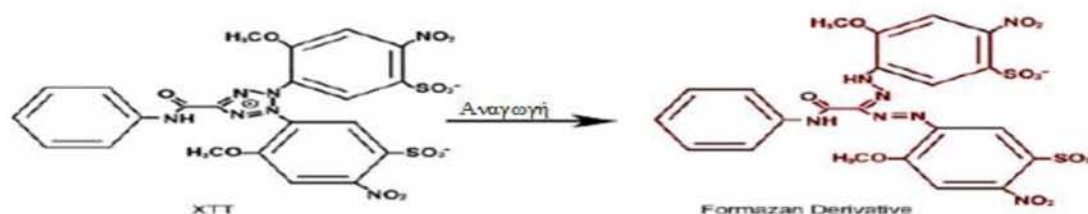
Οι κυτταρικές σειρές καλλιεργούνταν σε φλάσκες επιφάνειας 75cm<sup>2</sup> σε θρεπτικό υλικό DMEM (10 ml) το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με 10% FBS, 1% L-γλουταμίνη και 1% διάλυμα αντιβιοτικών σε ειδικό κλίβανο για επώαση και ανάπτυξη στους 37 °C και σε συγκέντρωση CO<sub>2</sub> 5%. Τα κύτταρα αναπτύσσονταν σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% ορό FBS μέχρι η επιφάνεια της φλάσκας να καλύπτεται από 70% έως 80% από κύτταρα. Όταν τα κύτταρα κάλυπταν το προαναφερθέν ποσοστό της επιφάνειας της φλάσκας, πραγματοποιούνταν επανακαλλιέργεια των κυττάρων. Η επανακαλλιέργεια των κυττάρων γινόταν μέσω της αποκόλλησης των κυττάρων χρησιμοποιώντας 1 ml θρυψίνης (0,25%). Η θρυψίνη με την δράση της βοηθά στην αποκόλληση των κυττάρων από την επιφάνεια της φλάσκας. Η επώαση με την θρυψίνη διαρκούσε 5 min στους 37 °C. Στη συνέχεια ακολουθούσε επαναιώρηση των αποκολλημένων κυττάρων σε θρεπτικό υλικό εμπλουτισμένο με 10% FBS. Τα κύτταρα μοιράζονταν σε καινούργιες φλάσκες, έτσι ώστε όταν κολλήσουν, σε κάθε καινούργια φλάσκα να καλύπτουν το 20% με 30% της επιφάνειας της. Η καλλιέργεια των κυττάρων έγινε με όσον το δυνατόν ασηπτικές συνθήκες σε θάλαμο ρεύματος αέρα συνεχούς ροής (Laminar air flow) για την

αποφυγή επιμολύνσεων. Επίσης ανά τακτά χρονικά διαστήματα γινόταν έλεγχος των κυττάρων με σκοπό την διάγνωση πιθανών επιμολύνσεων.

### 2.2.3. Προσδιορισμός της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος και του οξειδωτικού παράγοντα tBHP με τη μέθοδο XTT

Για να χρησιμοποιηθούν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις για τη μελέτη της αντιοξειδωτικής δράσης, αρχικά προσδιορίστηκε η κυτταροτοξική δράση του εκχυλίσματος. Για τον προσδιορισμό της κυτταροτοξικής δράσης του εκχυλίσματος και του οξειδωτικού παράγοντα tBHP, τόσο στα μυϊκά C2C12 όσο και στα ενδοθηλιακά EA.hy926 κύτταρα, στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκε το kit XTT assay της εταιρείας Roche.

Η μέθοδος XTT αποτελεί μια χρωματομετρική δοκιμή για την μη ραδιενεργή ποσοτικοποίηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της βιωσιμότητας. Η μέθοδος βασίζεται στον μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος (XTT) από μιτοχονδριακές δεϋδρογονάσες κυττάρων στον μεταβολίτη φορμαζάνη. Η φορμαζάνη είναι υδατοδιαλυτή, έχει πορτοκαλί χρώμα και απορροφά στα 450-500 nm και έτσι μπορεί να προσδιοριστεί φασματοφωτομετρικά. Μείωση του αριθμού των ζώντων κυττάρων οδηγεί σε μειωμένο μεταβολισμό του τετραμμωνιακού άλατος και συνεπώς σε μειωμένη απορρόφηση.



Εικόνα 20. Μεταβολισμός του XTT σε υδατοδιαλυτή φορμαζάνη από ζωντανά κύτταρα.



Μετά την αποκόλληση των κυττάρων με θρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, γίνεται μέτρησή τους με τη βοήθεια της αντικειμενοφόρου πλάκας Neubauer. Στη συνέχεια, γίνεται επίστρωση  $10^4$  κυττάρων ανά θέση σε ένα τριβλίο 96 θέσεων (96-well plate). Στα κύτταρα επίσης προστίθεται θρεπτικό υλικό με 10% FBS (150μl) και ακολουθεί επώαση για 24 ώρες στους  $37^{\circ}\text{C}$  και σε  $\text{CO}_2$  συγκέντρωσης 5% προκειμένου να προσκολληθούν. Μετά το πέρας της επώασης το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και ακολουθούσε προσθήκη διαφορετικών συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος (0, 1,25, 2,5, 10, 20, 30 και 50  $\mu\text{g/ml}$  για τα κύτταρα C2C12 και 0, 0,068, 0,125, 0,250, 0,65, 1,25, 2,5, 5, 10, 20 και 50  $\mu\text{g/ml}$  για τα κύτταρα EA.hy926) σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS (ώστε να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των συστατικών του FBS με το εκχύλισμα ή τον οξειδωτικό παράγοντα) συνολικού όγκου 100  $\mu\text{l}$ . Τα κύτταρα στα οποία προστέθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις της του εκχυλίσματος, επώαστηκαν για 24 h. Τα μυϊκά κύτταρα C2C12 μετά την προσθήκη του tBHP (0,3 mM) επώαστηκαν για 30 min και τα ενδοθηλιακά κύτταρα για 1 h. Μετά την επώαση προστίθενται 50  $\mu\text{l}$  από το μίγμα XTT reagent σε κάθε θέση και ακολουθεί επώαση για 4 h. (Το μείγμα του XTT reagent πρέπει να έχει την αναλογία 50:1 και η προετοιμασία του μίγματος γίνεται πριν τη χρησιμοποίησή του). Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιούνται και δείγματα ως αρνητικοί μάρτυρες, τα οποία περιείχαν μόνο κύτταρα και όχι XTT reagent. Επίσης, χρησιμοποιούνται και δείγματα μάρτυρες που περιείχαν το εκχύλισμα ή τον tBHP και XTT, χωρίς όμως να περιέχουν κύτταρα προκειμένου να παρατηρηθεί αν το εκχύλισμα απορροφά στα 450 nm. Μετά την τετράωρη επώαση προσδιορίζεται η απορρόφηση στα 450 nm με φασματοφωτόμετρο ELISA plate reader (Biotek) και τη χρήση του λογισμικού Gen5 (Biotek). Η εξέταση του εκχυλίσματος και του tBHP

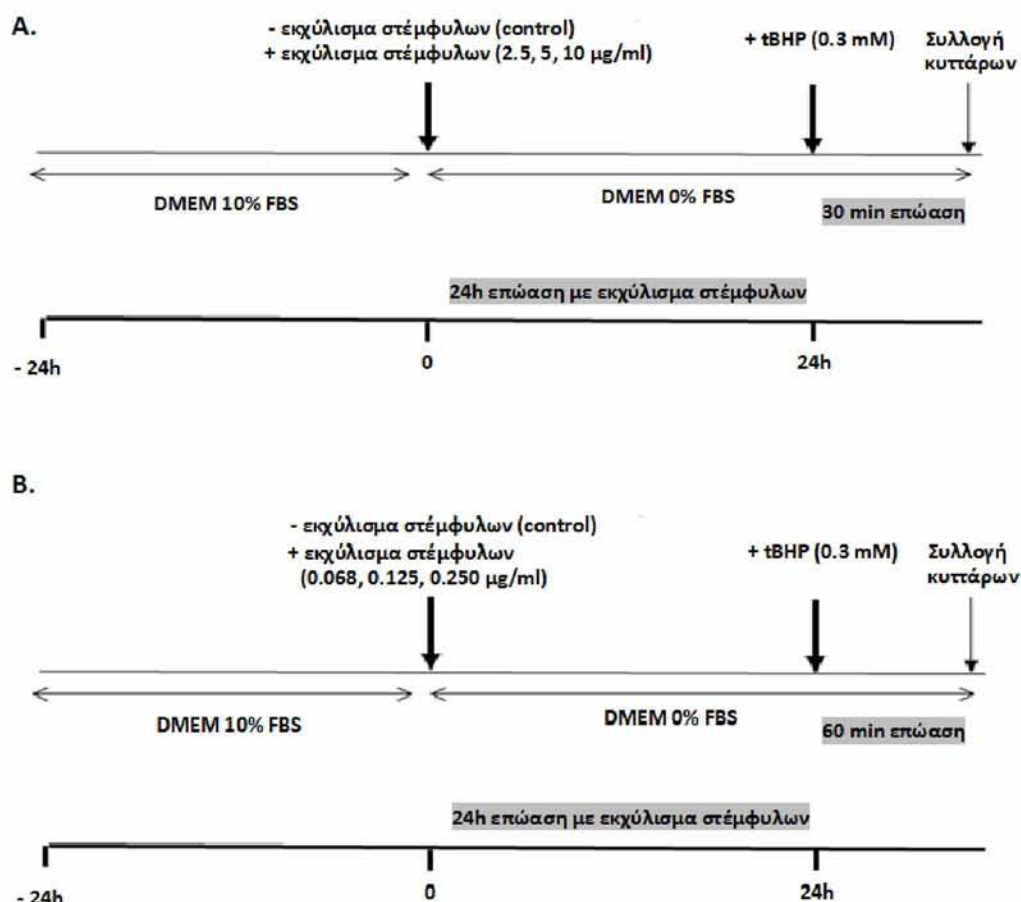
έγινε σε τρία διαφορετικά πειράματα και στο κάθε πείραμα η κάθε συγκέντρωση εξεταζόταν σε τριπλά δείγματα. Η % αναστολή του εκχυλίσματος ή του tBHP στην κυτταρική αύξηση των κυτταρικών σειρών C2C12 και EA.hy 926 υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\% \text{ αναστολή} = \frac{(\text{Ab.αρνητικού μάρτυρα} - \text{Ab.δείγματος})}{\text{Ab.αρνητικού μάρτυρα}} \times 100$$

#### **2.2.4. Πειραματικός σχεδιασμός της μελέτης της επίδρασης του εκχυλίσματος στα επίπεδα των δεικτών του οξειδωτικού στρες και της χορήγησης του οξειδωτικού παράγοντα t-BHP**

Ο πειραματικός σχεδιασμός παρουσιάζεται στην εικόνα 21. Τα μυϊκά κύτταρα C2C12 και τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 καλλιεργήθηκαν σε 25cm<sup>2</sup> φλάσκες καλλιέργειας για τον προσδιορισμό της GSH και των ROS και σε 75cm<sup>2</sup> φλάσκες καλλιέργειας για τον προσδιορισμό των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων με θρεπτικό υλικό DMEM (5 ml για τις 25cm<sup>2</sup> φλάσκες και 10 ml για τις 75cm<sup>2</sup> φλάσκες), το οποίο είναι εμπλουτισμένο με 10% FBS, για 24 h στους 37 °C σε συγκέντρωση CO<sub>2</sub> 5%. Στη συνέχεια το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και αντικαθίσταται με θρεπτικό υλικό DMEM απουσία FBS το οποίο περιέχει το εκχύλισμα στεμφύλων στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις. Στις φλάσκες που αποτελούσαν το μάρτυρα προστίθεται μόνο θρεπτικό υλικό απουσία ορού FBS. Μετά την προσθήκη του εκχυλίσματος ακολουθεί επώαση για 24 h. Μετά το τέλος της επώασης, το θρεπτικό υλικό αφαιρείται και προστίθεται ο παράγοντας tBHP (0,3 mM). Τα μυϊκά C2C12 κύτταρα μετά την προσθήκη του tBHP (0,3 mM) επωάζονται

για 30 min ενώ τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 για 1 h. Ακολουθεί αποκόλληση των κυττάρων με θρυψίνη (500 µl για τις 25cm<sup>2</sup> φλάσκες και 1 ml για τις 75cm<sup>2</sup> φλάσκες) (0,25%), επαναιώρηση σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4°C για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί πλύση των κυττάρων με PBS σε αναλογία 1:1 (0,01 M με pH 7,4) και φυγοκέντρηση στα 300g, στους 4 °C για 10 λεπτά. Μετά τη φυγοκέντρηση το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα επαναδιαλύεται σε PBS (0,01 M με pH 7,4) για τον προσδιορισμό των δεικτών του οξειδωτικού στρες (GSH, ROS, TBARS, πρωτεϊνικά καρβονύλια). Για τις μεθόδους προσδιορισμού των πρωτεϊνικών καρβονυλίων ακολούθησε λύση των κυττάρων με υπερήχους για 1 min σε περιοδικά διαστήματα των 10 sec. Παράλληλα μελετήθηκε και η επίδραση του εκχυλίσματος στεμφύλων στους δείκτες οξειδωτικού στρες στις συγκεντρώσεις που προαναφέρθηκαν απουσία της χορήγησης του παράγοντα tBHP. Δηλαδή τα κύτταρα αφού επώαστηκαν για 24 h με το εκχύλισμα ακολούθησε η επεξεργασία τους για την μελέτη των δεικτών χωρίς να προηγηθεί επώαση με τον παράγοντα tBHP.

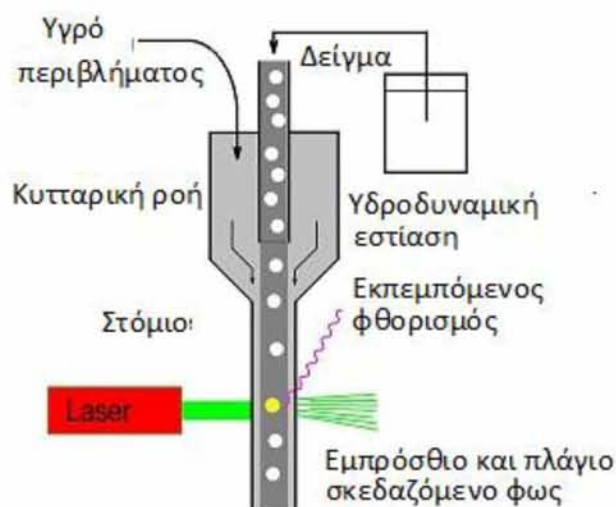


Εικόνα 21. Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος στεμφύλων σταφυλιών στους δείκτες οξειδωτικού στρες στα Α) μυϊκά C2C12 και Β) τα ενδοθηλιακά EA.hy926 κύτταρα. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 h σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% σε ορό FBS. Το φαρδύ βέλος συμβολίζει την αλλαγή υλικού σε DMEM απουσία ορού FBS και την προσθήκη του εκχυλίσματος στεμφύλων και του t-BHP. Το λεπτό βέλος συμβολίζει την ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη συλλογή των κυττάρων.

#### 2.2.5. Προσδιορισμός των επιπέδων της GSH και των ROS με κυτταρομετρία ροής

Η κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry, FC) είναι μια τεχνική αυτοματοποιημένης κυτταρικής ανάλυσης που επιτρέπει τη μέτρηση μεμονωμένων

σωματιδίων (κυττάρων, πυρήνων, χρωμοσωμάτων κ.λπ.) καθώς διέρχονται σε νηματική ροή από ένα σταθερό σημείο όπου προσπίπτει μία δέσμη φωτός. Τα πλεονεκτήματα της FC στηρίζονται κυρίως στη δυνατότητα να αναλύει με μεγάλη ταχύτητα, ακόμη και σε μικρά δείγματα, ταυτοχρόνως πολλαπλά φυσικά ή/και χημικά χαρακτηριστικά του κυττάρου. Ένα άλλο χαρακτηριστικό πλεονέκτημα που δεν το έχει άλλη μέθοδος είναι ότι προσφέρει τη δυνατότητα της πολυπαραμετρικής ανάλυσης του δείγματος συμπεριλαμβανομένου και της θέσης του κυτταρικού κύκλου στην οποία βρίσκονται. Η δέσμη φωτός (συνήθως δέσμη λέιζερ) ενός μεμονωμένου μήκους κύματος κατευθύνεται διαμέσου μιας υδροδυναμικά συγκλίνουσας ροής υγρού, η οποία προσπίπτει επάνω στα κύτταρα, καθώς ρέουν υδροδυναμικά εστιασμένα το ένα μετά το άλλο. Ένας αριθμός ανιχνευτών περιβάλλουν το σημείο όπου η δέσμη του φωτός διαπερνάει τη ροή του υγρού: ένας σε ευθυγράμμιση με τη δέσμη φωτός, κάποιοι άλλοι κάθετοι σε αυτήν και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού. Κάθε σωματίδιο μεταξύ 0,2 και 150 μικρομέτρων αιωρούμενο στο υγρό που περνά διαμέσου της δέσμης σκεδάζει το φως προς κάποια κατεύθυνση και παράλληλα τα φθορίζοντα χημικά που βρίσκονται στο σωματίδιο ή επί της επιφάνειάς του μπορούν να διεγερθούν και να εκπέμψουν φως άλλου μήκους κύματος από αυτό της πηγής. Αυτός ο συνδυασμός σκεδασμένου και φθορίζοντος φωτός παραλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και μετά από αναλύσεις είναι δυνατή η αποκόμιση πληροφοριών σχετικών με τη φυσική και χημική δομή κάθε μεμονωμένου σωματιδίου. Η εμπρόσθια σκέδαση "FSC" (εκ του Forward Scattering) σχετίζεται με τον όγκο του κυττάρου και η πλάγια σκέδαση "SSC" (εκ του Side Scattering) εξαρτάται από την εσωτερική πολυπλοκότητα του σωματιδίου (π.χ., σχήμα του πυρήνα, αριθμός κυτταροπλασματικών σωματιδίων ή αδρότητα κυτταρικής μεμβράνης).



Εικόνα 22. Υδροδυναμική εστίαση του δείγματος μέσα από το θάλαμο ροής.

Στην κυτταρομετρία ροής το υπό εξέταση υλικό, το οποίο πρέπει να είναι υπό μορφή εναιωρήματος (αίμα, μυελός των οστών ή άλλο παρασκευασθέν εναιώρημα κυττάρων από ιστούς), υπόκειται σε επεξεργασία με ειδικά κατά περίπτωση μονοκλωνικά αντισώματα συζευγμένα με φθορίζουσες ουσίες ή με φθορίζουσες χρωστικές ανάλογες προς τη χημική παράμετρο που αναζητείται. Στη συνέχεια ένα ένα τα κύτταρα υπό την επίδραση ρυθμίσεων υδροδυναμικής εστίασης έρχονται σε επαφή με μία ή περισσότερες ακτίνες laser διαφορετικού μήκους κύματος εκπεμπόμενης ακτινοβολίας και κατάλληλου για τη διέγερση των φθοριοχρωμάτων. Διάφοροι ειδικά διατεταγμένοι ανιχνευτές (έως και 18 βολταϊκές φωτοδίοδοι) μετρούν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός που προκύπτει από τη διάχυση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας μετά την πρόσκρουση της με τα κύτταρα προς όλες τις κατευθύνσεις στο χώρο. Λαμβάνονται κυρίως 4 φωτεινά σήματα: το απευθείας σκεδαζόμενο φως (FSC), το υπό ορθή γωνία σκεδαζόμενο φως (SSC), ο παραγόμενος

φθορισμός και η απορρόφηση μέρους της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Ο συνδυασμός αυτών των φωτεινών σημάτων παράγει ένα ρεύμα παλμού που ενισχύεται και εκφράζεται σαν μία σειρά εξειδικευμένων παλμών, τα αναλογικά σήματα, τα οποία στη συνέχεια μετατρέπονται σε ψηφιακά με τους μετατροπείς αναλογικού σήματος σε ψηφιακό (ADC system). Τα σήματα αυτά καταχωρούνται, ταξινομούνται, δημιουργούνται οι κατανομές συχνότητας των υπό διερεύνηση κυτταρικών παραμέτρων και αναλύονται με την χρήση ειδικών προγραμμάτων ηλεκτρονικών υπολογιστών. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εξετασθούν δεκάδες κυτταρικές παράμετροι μεγάλου αριθμού κυττάρων σε μικρό χρονικό διάστημα (>1000 κύτταρα/δευτερόλεπτο). Εκτός από τη μελέτη των διαφόρων κυτταρικών χαρακτηριστικών, η τεχνική της κυτταρομετρίας ροής είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί και για διαλογή κυττάρων (cell sorting). Καθώς τα κύτταρα/σωματίδια του εναιωρήματος περνούν από την πηγή φωτός, δύναται εκλεκτικά να φορτισθούν και έτσι κατά την έξοδο τους διαχωρίζονται ανάλογα με το φορτίο τους, συλλέγοντας με αυτό τον τρόπο καθαρούς κυτταρικούς πληθυσμούς από το αρχικό μείγμα, με μεγάλη ταχύτητα και ακρίβεια.

Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της GSH και των ROS προσδιορίστηκαν με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας τις χρωστικές mercury orange και DCF-DA, αντίστοιχα. Συγκεκριμένα, η φθορίζουσα χρωστική mercury orange προσδένεται απευθείας στην GSH (μία ένωση που προσδένεται στοιχειομετρικά στις σουλφυδρυλικές ομάδες) ενώ η DCF-DA αποακετυλιώνεται από κυτταρικές εστεράσες σε μία μη φθορίζουσα ένωση, η οποία αργότερα οξειδώνεται από τις ROS στην φθορίζουσα DCF. Παρασκευάστηκε ένα στοκ διάλυμα της χρωστικής mercury orange (400  $\mu$ M) διαλυμένης σε ακετόνη και αποθηκεύτηκε στους 4 °C, ενώ ένα φρέσκο διάλυμα της χρωστικής DCF-DA (100  $\mu$ M) διαλυμένης σε μεθανόλη

παρασκευαζόταν πριν από κάθε πείραμα. Το κυτταρικό αιώρημα επαναδιαλύεται σε 150  $\mu$ l PBS και επωάζονται παρουσία της χρωστικής mercury orange (15  $\mu$ l) (40 $\mu$ M) ή της χρωστικής DCF-DA (15  $\mu$ l) (10 $\mu$ M), για τον προσδιορισμό της GSH ή των ROS αντίστοιχα, στο σκοτάδι στους 37°C για 30 min. Ακολουθεί πλύση και επαναδιάλυση των κυττάρων σε 250  $\mu$ l PBS και φυγοκέντρωση στα 300 g, στους 4°C για 10 min. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, προστίθενται 250  $\mu$ l PBS και προχωράμε στην ανάλυση με τη χρήση κυτταρομέτρου ροής FACScan (Becton Dickinson, NJ, USA) με φάσμα διέγερσης και εκπομπής στα 488 και 530 nm για τα ROS και τα 488 και 580 nm για την GSH. Επίσης μετρήθηκαν η εμπρόσθια και δεξιά οπτική γωνία σκέδασης του φωτός που δείχνουν το μέγεθος και την εσωτερική πολυπλοκότητα των κυττάρων. Τα κύτταρα αναλύθηκαν με έναν ρυθμό 100-200 γεγονότων/δευτερόλεπτο. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε 10.000 κύτταρα ανά δείγμα και η ένταση φθορισμού μετρήθηκε σε λογαριθμική κλίμακα. Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό BD Cell Quest (Becton Dickinson). Το κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε τουλάχιστον τρεις φορές.

#### **2.2.6. Προσδιορισμός των επιπέδων των TBARS**

Ο προσδιορισμός των επιπέδων των TBARS ενός δείκτη της λιπιδικής υπεροξείδωσης βασίστηκε στη μέθοδο των Keles et al. (2001).

400  $\mu$ l κυτταρικού αιωρήματος αναμειγνύονται με 500  $\mu$ l διαλύματος 35% TCA και 500  $\mu$ l διαλύματος Tris-HCl (200 mM, pH 7,4). Τα δείγματα επωάζονται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου. Στην συνέχεια προστίθενται 1 ml διαλύματος 2 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και 55 mM TBA και τα δείγματα επωάζονται για 45 min στους 95°C (σε υδατόλουτρο). Μετά την επώαση τα δείγματα κρυώνουν για 5 min σε πάγο και ακολουθεί προσθήκη 1 ml διαλύματος 70% TCA. Μετά από ανάδευση, 1 ml του κάθε



δείγματος φυγοκεντρείται στα 15000 g για 3 min. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης του υπερκείμενου στα 530 nm. Τα δείγματα χωρίς το κυτταρικό αιώρημα αποτελούσαν το τυφλό και ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως nmol ουσιών που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ ανά mg πρωτεΐνης του κυτταρικού αιωρήματος. Η συγκέντρωση των TBARS υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακής απόσβεσης της MDA. Η μέτρηση απαιτεί >30μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{TBARS (nmol / mg πρωτεΐνης)} = \frac{(A_{\delta} - A_0) / 0,156}{C_{\delta}} \times 7,5$$

A<sub>δ</sub>: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

A<sub>0</sub>: Η μέση τιμή της απορρόφησης του τυφλού.

ε<sub>530</sub> MDA (μM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>): 0,156 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης της μαλονδιαλδεϋδης.

Τιμή 7,5: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος (Vτελ.αντίδρασης/ μl αιωρήματος [3000 μl/400 μl]).

C<sub>δ</sub>: Η συγκέντρωση mg/ml της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford

#### **2.2.7. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων**

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνικών καρβονυλίων βασίστηκε στη μέθοδο των Patsoukis et al. (2004).

Πιο αναλυτικά, 200  $\mu$ l 20% TCA προστίθενται σε 200  $\mu$ l κυτταροπλάσματικού αιωρήματος (κάθε δείγμα έχει το τυφλό του), τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 15 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 500  $\mu$ L DNPH 10 mM (διαλυμένο σε 2,5N HCL) για τα δείγματα ή 500  $\mu$ L 2,5N HCL για τα τυφλά. Ακολουθεί επώαση των δειγμάτων για 1 h στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου με ενδιάμεση ανάδευση κάθε 15 min και στο τέλος φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθενται 1 ml 10% TCA. Ακολουθεί ανάδευση και φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και προστίθεται 1 ml μίγματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v) ενώ γίνεται φυγοκέντρηση στα 15000 g για 5 min στους 4°C. Το συγκεκριμένο βήμα επαναλαμβάνεται δύο ακόμη φορές. Στο τέλος προστίθενται 1 ml 5M ουρίας (pH 2.3) και τα δείγματα επωάζονται στους 37°C για 15 min. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 15000 g για 3 min στους 4°C και μετριέται η απορρόφηση στα 375nm.

Η συγκέντρωση πρωτεϊνικών καρβονυλίων υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακή απόσβεσης του DNPH. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Protein carbonyls (nmol/mg protein)} = \frac{(\text{A}_{\text{sample}} - \text{A}_{\text{blank}}) / 0.022}{C \delta} \times 5$$

A sample: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του δείγματος.

A blank: Η μέση τιμή της οπτικής απορρόφησης του τυφλού.

ε375 DNPH (nmol/ml): 0,022 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του DNPH

Τιμή 5: Ο συντελεστής αραιώσης του αιωρήματος Ντελ. αντίδρασης/ μl πλάσματος [1000 μl /200 μl]).

Σδ: Η συγκέντρωση mg/ml της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

#### **2.2.8. Προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford**

Ο προσδιορισμός συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων έγινε μέσω πρότυπης καμπύλης της πρωτεΐνης αλβουμίνης μέσω του αντιδραστηρίου Bradford. Το αντιδραστήριο Bradford χρησιμοποιείται συχνά για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης. Η μέθοδος βασίζεται στην αλληλεπίδραση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 του αντιδραστηρίου με τα αμινοξέα των πρωτεϊνών οδηγώντας στο σχηματισμό χρωμογόνου προϊόντος με μπλε χρώμα το οποίο έχει οπτική απορρόφηση στα 595 nm (Bradford, 1976).

Για την πρότυπη καμπύλη αλβουμίνης πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις διαλύματος αλβουμίνης 10 mg/ml ώστε να προκύψουν διαλύματα συγκεντρώσεις 50, 100, 200, 400, 800, 1000 και 1400 μg/ml. Για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης 20 μl διαλύματος αλβουμίνης με τις παραπάνω συγκεντρώσεις προστέθηκε σε 1 ml διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Τα δείγματα ανακινούνται απαλά και επωάζονται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να σταθεροποιηθεί το χρώμα. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm. Ως τυφλό χρησιμοποιείται διάλυμα που περιέχει 20 μl H<sub>2</sub>O και 1 ml διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Οι συγκεντρώσεις αλβουμίνης 50-1400 αντιστοιχούν στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης στα 595 nm που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις της αλβουμίνης κατασκευάστηκε η πρότυπη καμπύλη. Για τον προσδιορισμό της συνολικής ποσότητας πρωτεΐνης των δειγμάτων 20 μl προστίθενται κάθε φορά σε 1 ml διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford. Ακολουθεί αντιστοίχιση της τιμής οπτικής απορρόφησης με την συγκέντρωση αλβουμίνης από την πρότυπη καμπύλη.

#### **2.2.9. Στατιστική ανάλυση**

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ανάλυσης SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS). Για τη στατιστική ανάλυση υπολογιζόταν αρχικά για κάθε δείγμα η μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation) και το τυπικό σφάλμα (standard error).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα, 1-way ANOVA. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του τεστ του Dunnett. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως  $\text{mean} \pm \text{SEM}$ .

### **2.3. Αποτελέσματα**

#### **2.3.1. Πολυφαινολικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος στεμφύλων**

Η ποιοτική πολυφαινολική σύνθεση του εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με υγρή χρωματογραφία - υψηλής ανάλυσης φασματομετρία μάζας (LC-HRMS). Η

ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε προηγούμενη μελέτη (Veskoukis et al., 2012) του εργαστηρίου Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Έτσι, φαίνεται ότι το εκχύλισμα αποτελείται από τις φλαβαν-3-όλες, κατεχίνη και επικατεχίνη που εντοπίζονται σε θερμοκρασία δωματίου με  $R_t = 3,83$  λεπτά και  $R_t = 5,93$  λεπτά αντίστοιχα, και ανιχνεύθηκαν με θετικό και αρνητικό τρόπο με βάση τα ψευδομοριακά ιόντα τους σε αναλογία  $[M+H]^+$  μάζας προς φορτίο ( $m/z$ ) 291.0863 και  $[M-H]^-$  σε  $m/z$  289.0707, αντίστοιχα (Veskoukis et al., 2012). Επιπλέον, η φλαβαν-3-όλη, γαλλική-3-επιγαλοκατεχίνη ταυτοποιήθηκε σε  $R_t = 9,25$  λεπτά βασισμένη στο ψευδομοριακό ιόν του  $[M-H]^-$  σε  $m/z$  441.0816 (Veskoukis et al., 2012). Επιπλέον, οι ανθοκυανιδίνες κυανιδίνη, μαλβιδίνη, δελφινιδίνη, και πετουνιδίνη εντοπίστηκαν στα 9.25, 11.74, 13.55, και 15.99 λεπτά αντίστοιχα με βάση τα ψευδομοριακά ιόντα τους  $[M-H]^-$  σε  $m/z$  609.1467,  $[M+H]^+$  σε  $m/z$  331.0812,  $[M-H]^-$  στο  $m/z$  301.0359, και  $[M-H]^-$  σε  $m/z$  315.0516, αντίστοιχα. Επιπλέον, η ανθοκυανίνες, μυρτιλλίνη, κουμαρίνη, οενίνη και 3-O-γλυκοσίδιο της πεονιδίνης ανιχνεύθηκαν στα 9,53, 10,63, 6,72, και 5,76 λεπτά με βάση τα ψευδομοριακά ιόντα τους που αντιστοιχούν σε  $[M-H]^-$  σε  $m/z$  463.0888  $[M-H]^-$  σε  $m/z$  447.0939,  $[M-H]^-$  σε  $m/z$  491.1201, και  $[M+H]^+$   $m/z$  463.1235, αντίστοιχα. Οι φλαβονόλες, κερκετίνη εντοπίστηκε σε  $R_t = 9,56$  λεπτά και η καμπερόλη σε  $R_t = 15,79$  λεπτά με βάση τα ψευδομοριακά τους ιόντα  $[M-H]^-$  σε  $m/z$  301.0357 και  $[M-H]^-$  σε  $m/z$  285.0407, αντίστοιχα. Εκτός από τα παραπάνω φλαβονοειδή, δυο φαινολικά οξέα, το γαλλικό οξύ ( $R_t = 0,78$  min) και το καφαρικό οξύ ( $R_t = 26,18$  min), εντοπίστηκαν επίσης με βάση τα ψευδομοριακά τους ιόντα  $[M-H]^-$  σε  $m/z$  169.0147 και  $[M-H]^-$  σε  $m/z$  311.0398, αντίστοιχα. Τέλος, το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος εκτιμήθηκε και βρέθηκε να είναι 648 mg γαλλικού οξέος ανά γραμμάριο εκχυλίσματος (Veskoukis et al., 2012).

Πίνακας 3. Πολυφαινολικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος στεμφύλων όπως προσδιορίστηκε με τη χρήση της μεθόδου LC-HRMS.

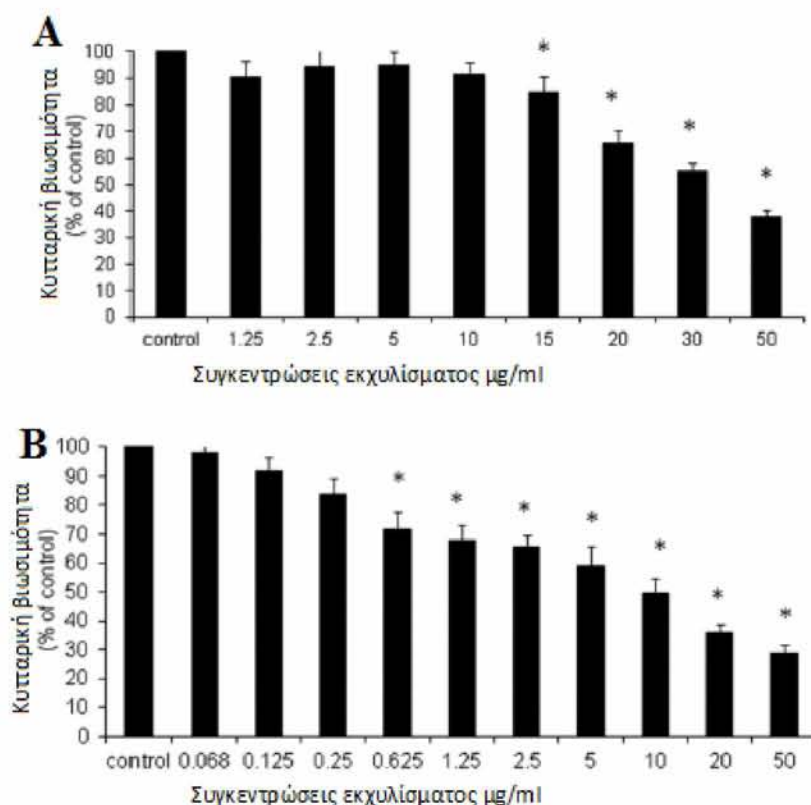
Πολυφαινόλες	$R_t$ (min) <sup>a</sup>	$m/z$ $[M \pm H]^{\pm a}$
Φλαβαν-3-όλες		
Κατεχίνη	3.83	291.0863 $[M+H]^+$ 289.0707 $[M-H]^-$
Επικατεχίνη	5.93	291.0863 $[M+H]^+$ 289.0707 $[M-H]^-$
3-Γαλλική-Επικατεχίνη	9.25	441.0816 $[M-H]^-$
Ανθοκυανιδίνες		
Κυανιδίνη	9.25	609.1467 $[M-H]^-$
Μαλβιδίνη	11.74	331.0812 $[M+H]^+$
Δελφινιδίνη	13.55	301.0359 $[M-H]^-$
Πετουνιδίνη	15.99	315.0516 $[M-H]^-$
Ανθοκυανίνες		
Μυρτιλίνη	9.53	463.0888 $[M-H]^-$
Κουρομανίνη	10.63	447.0939 $[M-H]^-$
Οενίνη	6.72	491.1201 $[M-H]^-$
3-Ο-γλυκοσίδιο Πεονιδίνης	5.76	463.1235 $[M+H]^+$
Φαινολικά οξέα		
Γαλλικό οξύ	0.78	169.0147 $[M-H]^-$
Καφταρικό οξύ	26.18	311.0398 $[M-H]^-$
Φλαβονόλες		
Κερκετίνη	9.56	301.0357 $[M-H]^-$
Καμφερόλη	15.79	285.0407 $[M-H]^-$
TPC (mg γαλλικού οξέος/ g εκχυλίσματος)		648

### 2.3.2. Επίδραση του εκχυλίσματος σταφυλιού στη βιωσιμότητα των C2C12 και EA.hy926 κύτταρων.

Η μέθοδος προσδιορισμού της βιωσιμότητας των κυττάρων XTT χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της επίδρασης της χορήγησης του εκχυλίσματος στεμφύλων σταφυλιού στη βιωσιμότητα των κυττάρων C2C12 και EA.hy926. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το εκχύλισμα σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 10  $\mu\text{g/ml}$  μειώνει σημαντικά τη βιωσιμότητα των μυϊκών κυττάρων C2C12 (εικόνα 23 Α). Έτσι,



οι συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος που επιλέχθηκαν για τη μελέτη ήταν 2,5, 5 και 10  $\mu\text{g/ml}$ , οι οποίες δεν εμφάνιζαν κυτταροτοξική δράση. Στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, το εκχύλισμα εμφάνισε κυτταροτοξικότητα σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις συγκριτικά με τα C2C12 κύτταρα (εικόνα 23B). Συγκεκριμένα, κυτταροτοξική δράση εμφανιζόταν σε συγκεντρώσεις εκχυλίσματος μεγαλύτερες από 0,675  $\mu\text{g/ml}$  (εικόνα 23B). Ως εκ τούτου, για τα EA.hy926 κύτταρα, οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0,068, 0,125, και 0,250  $\mu\text{g/ml}$ .

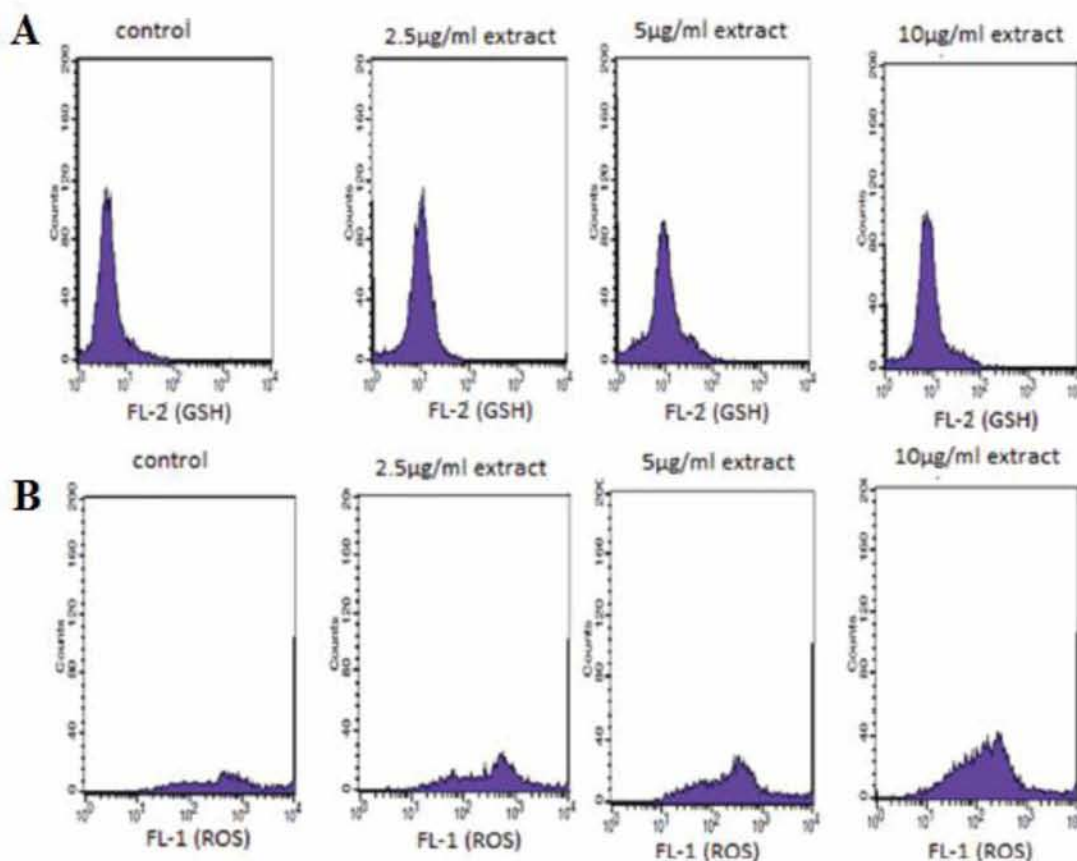


Εικόνα 23. Κυτταρική βιωσιμότητα μετά την χορήγηση του εκχυλίσματος στα (A) C2C12 κύτταρα και (B) EA.hy926 κύτταρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. \* $p < 0.05$ : Στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου.

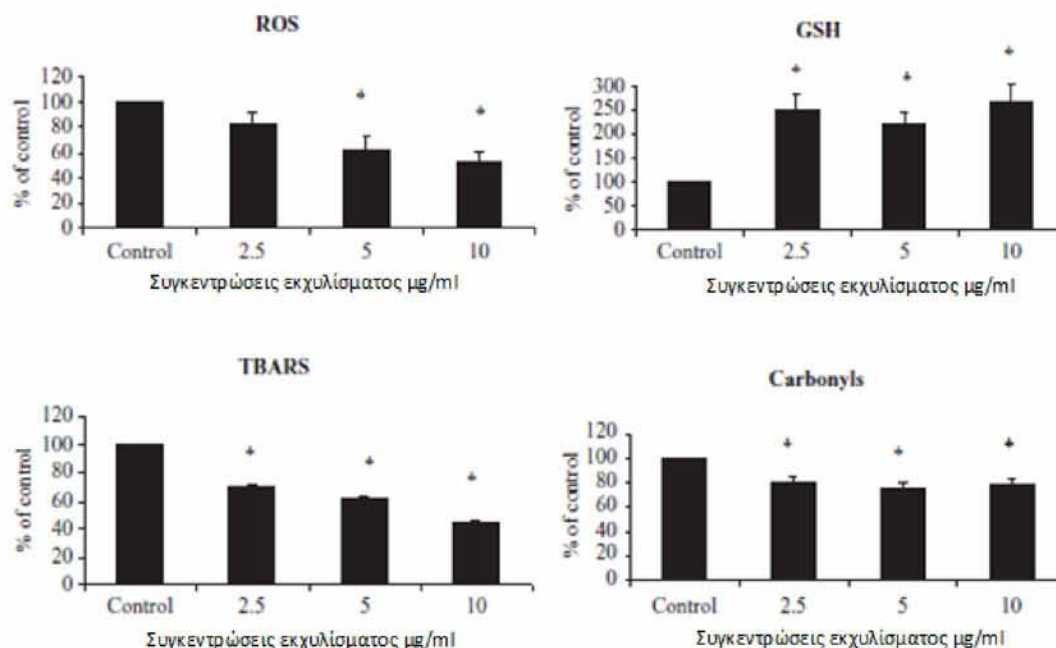
### **2.3.3. Επιδράσεις της χορήγησης εκχυλίσματος στεμφύλων σε δείκτες οξειδωτικού στρες στα C2C12 κύτταρα.**

Το οξειδωτικό στρες εκτιμήθηκε με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας τις χρωστικές DCF-DA για τον προσδιορισμό των ROS και mercury orange για τον προσδιορισμό της GSH. Επίσης φασματοφωτομετρικά μελετήθηκαν τα επίπεδα των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Τα ιστογράμματα που υποδεικνύουν τον αριθμό των κυττάρων έναντι του φθορισμού DCF-DA ή mercury orange φαίνονται στην εικόνα 24A και 24B, αντίστοιχα. Οι μέσες τιμές της έντασης του φθορισμού αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό BD Cell Quest και εκφράζονται ποσοστιαία ως προς τα κύτταρα ελέγχου (χωρίς χορήγησης εκχυλίσματος) (εικόνα 25). Η χορήγηση του εκχυλίσματος στεμφύλων στα κύτταρα C2C12, στις συγκεντρώσεις των 5 και 10  $\mu\text{g/ml}$  μείωσε στατιστικώς σημαντικά τα επίπεδα των ROS κατά  $28,80 \pm 10,8\%$  και  $47,60 \pm 8,5\%$ , αντίστοιχα, συγκριτικά με τα κύτταρα ελέγχου (εικόνα 25). Επιπλέον, η ανάλυση των αποτελεσμάτων της κυτταρομετρίας ροής έδειξε ότι η χορήγηση του εκχυλίσματος αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της GSH κατά  $151 \pm 28,3\%$ ,  $119 \pm 27,2\%$ , και  $168 \pm 33,7\%$  στις συγκεντρώσεις των 2,5, 5, και 10  $\mu\text{g/ml}$ , αντίστοιχα (εικόνα 25). Παρόμοια με τα επίπεδα των ROS, η χορήγηση του εκχυλίσματος στεμφύλων μείωσε σημαντικά τα επίπεδα των TBARS κατά  $29,30 \pm 1,6\%$ ,  $37,60 \pm 1,7\%$ , και  $54,07 \pm 2,2\%$  στα 2,5, 5, και 10  $\mu\text{g/ml}$ , αντίστοιχα (εικόνα 25). Επιπλέον, η χορήγηση του εκχυλίσματος προκάλεσε σημαντική μείωση στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων κατά  $20,00 \pm 5\%$ ,  $24,60 \pm 4,3\%$ , και  $21,80 \pm 3,9\%$  στις συγκεντρώσεις των 2,5, 5 και 10  $\mu\text{g/ml}$ , αντιστοίχως (εικόνα 25).





Εικόνα 24. Επίδραση της χορήγησης του εκχυλίσματος στεμφύλων για 24 ώρες στους δείκτες οξειδωτικού στρες στα κύτταρα C2C12. (α) Τα ιστογράμματα που παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με το φθορισμό τους (10000 κύτταρα) όπως προκύπτουν από την κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση της GSH. Το FL2 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση του φθορισμού χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής αντιστοίχως. (β) Τα ιστογράμματα που παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με το φθορισμό τους (10000 κύτταρα) όπως προκύπτουν από την κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση των ROS. Το FL1 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση του φθορισμού χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής αντιστοίχως. Για την μέτρηση των ROS και της GSH, τα κύτταρα C2C12 επώαστηκαν με 10 mM DCF-DA και 40 mM mercury orange, αντίστοιχα, για 30 λεπτά στους 37°C. Τα κύτταρα στη συνέχεια πλύθηκαν, επαναδιαλύθηκαν σε PBS, και αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής, όπως περιγράφεται παραπάνω. (γ) Παρουσιάζεται η επίδραση της χορήγησης του εκχυλίσματος στεμφύλων στα επίπεδα των ROS, GSH, TBARS, και πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Τα επίπεδα των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων εκτιμήθηκαν με φασματοφωτομετρικά. Όλες οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. \*  $p < 0.05$ : στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου.

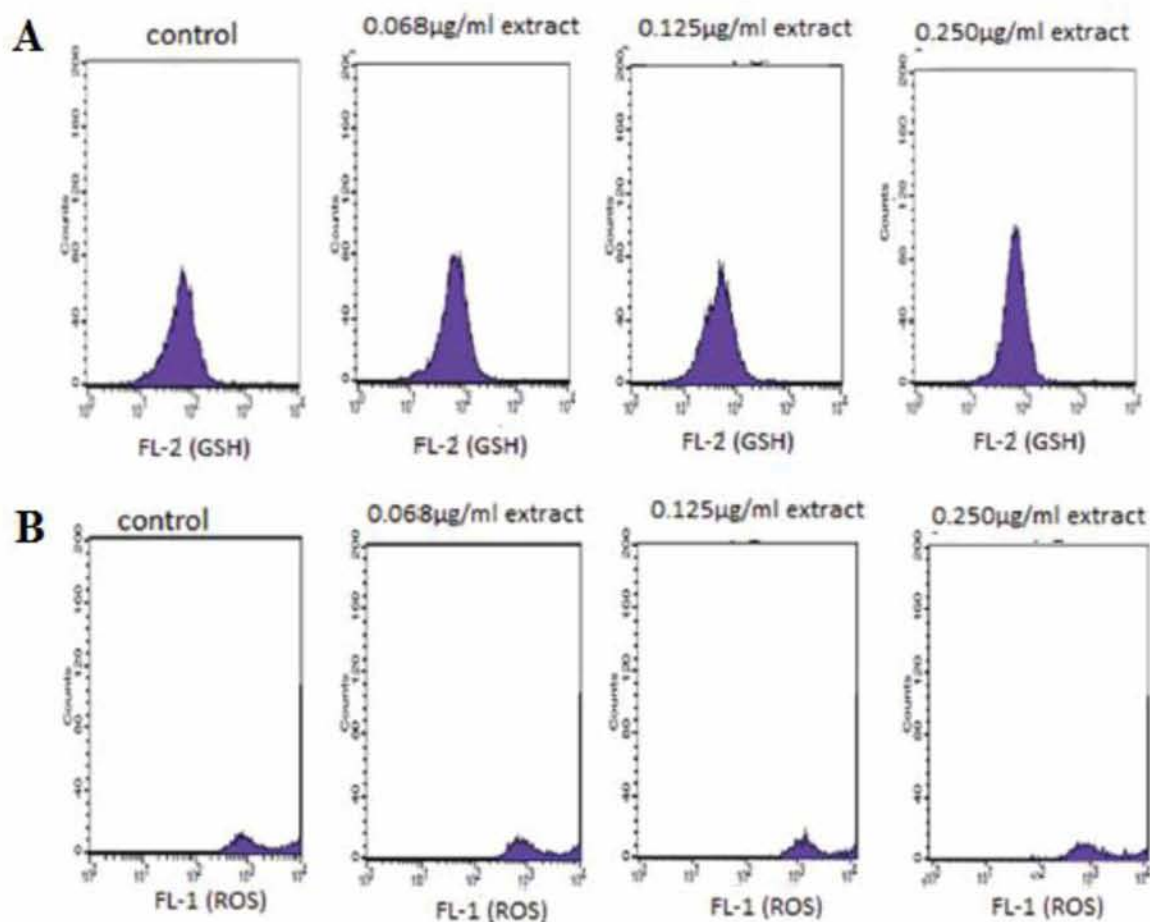


Εικόνα 25. Παρουσιάζεται η επίδραση της χορήγησης του εκχυλίσματος στεμφύλων στα επίπεδα των ROS, GSH, TBARS, και πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Τα επίπεδα των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων εκτιμήθηκαν με φασματοφωτομετρικά. Όλες οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. \*  $p < 0.05$ : στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου.

#### 2.3.4. Επίδρασεις της χορήγησης εκχυλίσματος στεμφύλων σε δείκτες οξειδωτικού στρες στα EA.hy926 κύτταρα.

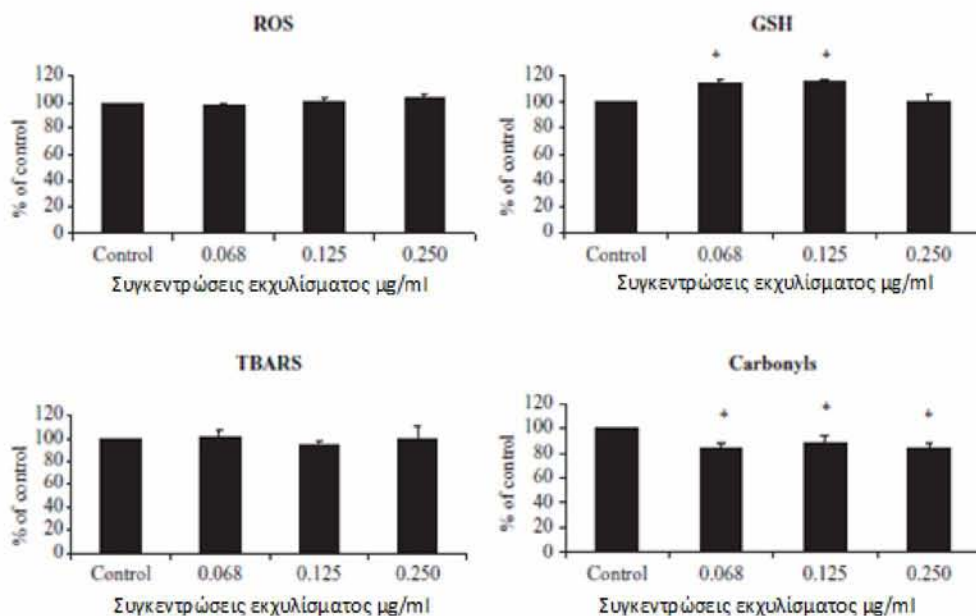
Τα ιστογράμματα που υποδεικνύουν τον αριθμό των κυττάρων σε σχέση με τα επίπεδα φθορισμού της DCF-DA ή της mercury orange στα EA.hy926 κύτταρα μετά τη χορήγηση του εκχυλίσματος φαίνονται στην εικόνα 26 A και 26B, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα από την ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής έδειξαν ότι η κατεργασία με το εκχύλισμα αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης κατά περίπου  $15,00 \pm 2\%$  τόσο στη συγκέντρωση των  $0,068 \mu\text{g/ml}$  όσο και στη συγκέντρωση των  $0,125 \mu\text{g/ml}$  (εικόνα 27). Επιπλέον, το εκχύλισμα στεμφύλων προκάλεσε μια σημαντική μείωση στα επίπεδα των πρωτεϊνικών

καρβονυλίων κατά  $16,80 \pm 4,2\%$ ,  $11,70 \pm 1,3\%$ , και  $16,00 \pm 4,5\%$  στις συγκεντρώσεις των 0,068, 0,125, και 0,250  $\mu\text{g/ml}$  (εικόνα 27). Ωστόσο, τα επίπεδα των ROS και των TBARS δεν επηρεάστηκαν από τη χορήγηση του εκχυλίσματος σε καμία από τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (εικόνα 27).



Εικόνα 26. Επίδραση της χορήγησης του εκχυλίσματος στεμφύλων για 24 ώρες στους δείκτες οξειδωτικού στρες στα κύτταρα EA.hy926. (A) Τα ιστογράμματα που παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με το φθορισμό τους (10000 κύτταρα) όπως προκύπτουν από την κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση της GSH. Το FL2 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση του φθορισμού χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής αντιστοίχως. (B) Τα ιστογράμματα που παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με το φθορισμό τους (10000 κύτταρα) όπως προκύπτουν από την κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση των ROS. Το FL1 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση του φθορισμού χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής αντιστοίχως. Για την μέτρηση των ROS και της GSH, τα κύτταρα C2C12 επώαστηκαν με 10 mM DCF-DA και 40 mM mercury orange, αντίστοιχα, για 30 λεπτά στους 37°C. Τα κύτταρα στη συνέχεια πλύθηκαν, επαναδιαλύθηκαν σε PBS, και αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής, όπως περιγράφεται παραπάνω.



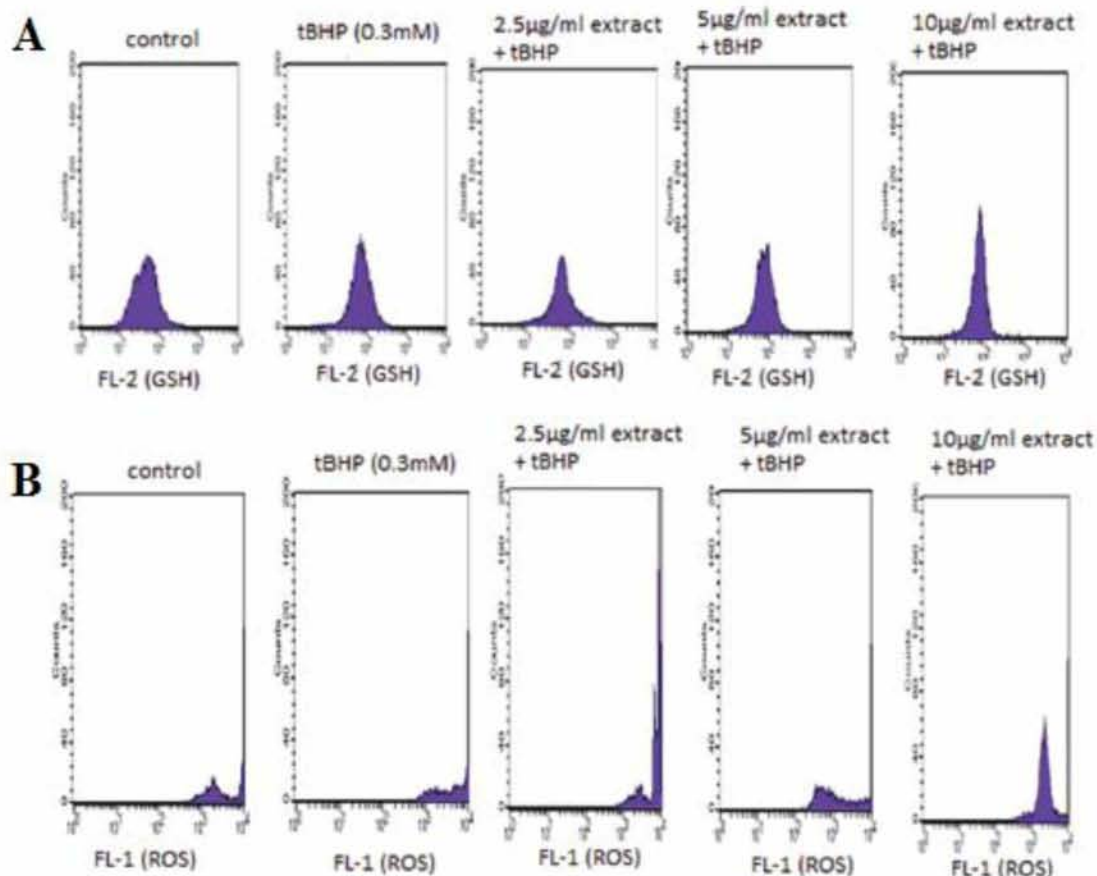


Εικόνα 27. Παρουσιάζεται η επίδραση της χορήγησης του εκχυλίσματος στεμφύλων στα επίπεδα των ROS, GSH, TBARS, και Πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Τα επίπεδα των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων εκτιμήθηκαν με φασματοφωτομετρικά. Όλες οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. \*  $p < 0.05$ : στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου.

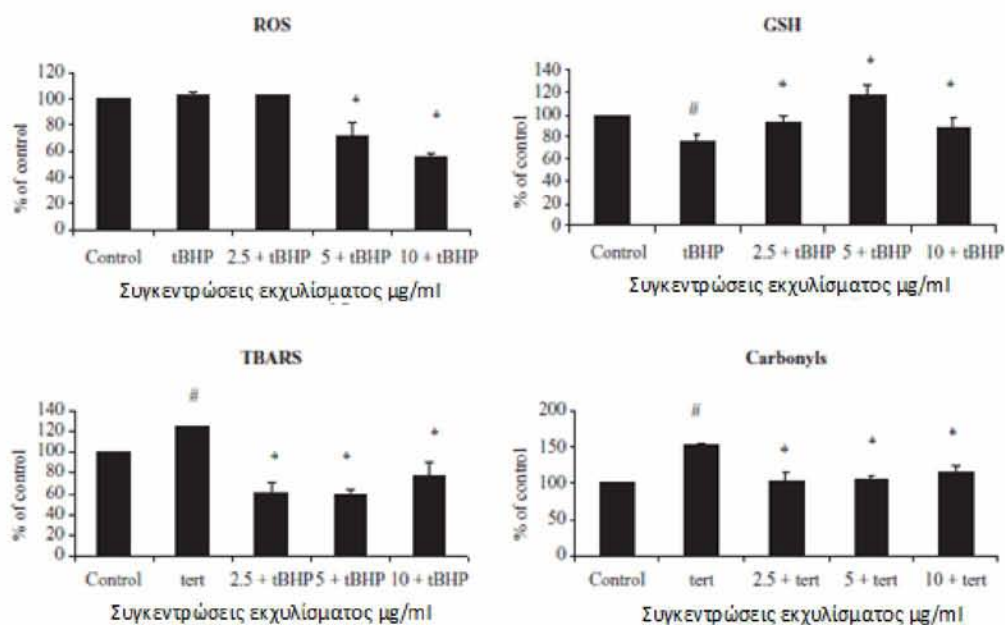
### 2.3.5. Προστατευτικές επιδράσεις του εκχυλίσματος στεμφύλων έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από το tBHP στα κύτταρα C2C12.

Τα ιστογράμματα της κυτταρομετρίας ροής υποδεικνύουν τον αριθμό των κυττάρων σε σχέση με τα επίπεδα φθορισμού της DCF-DA ή της mercury orange που χρησιμοποιούνται για τη χρώση των ROS και GSH, αντίστοιχα, για τα κύτταρα C2C12 μετά την χορήγηση του παράγοντα tBHP, έπειτα από την ανάπτυξη των κυττάρων σε θρεπτικό μέσω που περιείχε εκχύλισμα στεμφύλων παρουσιάζονται στην εικόνα 28Α και 28Β, αντίστοιχα. Όσον αφορά τα επίπεδα των ROS, ο tBHP δεν

είχε καμία επίδραση σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών από τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου (π.χ. GSH) ή/και από την αντίδρασή τους με άλλα μόρια. Έτσι, αν και ο tBHP παράγει ελεύθερες ρίζες, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στα επίπεδά τους την χρονική στιγμή που μελετήσαμε. Για παράδειγμα, παρατηρήθηκε μια μείωση στα επίπεδα της GSH και μια αύξηση στα επίπεδα των TBARS (εικόνα 29) μετά τη δράση του tBHP, υποδεικνύοντας ότι οι ελεύθερες ρίζες αντιδρούν με GSH και λιπίδια των κυττάρων. Ωστόσο, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η κατεργασία των κυττάρων C2C12 με το εκχύλισμα σταφυλιού σε συγκεντρώσεις 5 και 10  $\mu\text{g/ml}$ , πριν τη χορήγηση του tBHP, μείωσε σημαντικά τα επίπεδα ROS κατά  $38,80 \pm 5\%$  και  $47,60 \pm 3\%$  αντίστοιχα, σε σύγκριση με τη χορήγηση μόνο του tBHP (εικόνα 29). Εξάλλου, η ανάλυση της κυτταρομετρίας ροής έδειξε ότι το εκχύλισμα στεμφύλων σταφυλιού αύξησε τα επίπεδα της GSH σημαντικά κατά  $22,00 \pm 6,2\%$ ,  $54,00 \pm 8,1\%$  και  $17,00 \pm 8,3\%$  στις συγκεντρώσεις των 2,5, 5 και 10  $\mu\text{g/mL}$  αντίστοιχα, συγκριτικά με τη χορήγηση μόνο του tBHP (εικόνα 29). Όσον αφορά την επίδραση του εκχυλίσματος στην υπεροξείδωση των λιπιδίων, φάνηκε ότι το εκχύλισμα στεμφύλων ανέστειλε σημαντικά την επαγόμενη από tBHP αύξηση των επιπέδων των TBARS κατά  $51,00 \pm 12,3\%$ ,  $52,40 \pm 10,4\%$  και  $36,70 \pm 16,7\%$  στις συγκεντρώσεις των 2,5, 5, και 10  $\mu\text{g/ml}$  αντίστοιχα (εικόνα 29). Τέλος, το εκχύλισμα μείωσε τις tBHP-επαγόμενες αυξήσεις στα πρωτεϊνικά καρβονύλια κατά  $32,00 \pm 8,1\%$ ,  $31,20 \pm 4,6\%$ , και  $24,90 \pm 8,4\%$  σε 2,5, 5 και 10  $\mu\text{g/ml}$  αντιστοίχως (εικόνα 29).



Εικόνα 28. Επίδραση της χορήγησης του tBHP μόνο του ή μετά την χορήγηση εκχυλίσματος στεμφύλων στους δείκτες οξειδωτικού στρες στα κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα μελετήθηκαν υπό τρεις διαφορετικές συνθήκες: υπό συνθήκες ελέγχου, υπό την χορήγηση του tBHP (0,3 mM) για 30 λεπτά, και κάτω από το συνδυασμό χορήγησης του εκχυλίσματος σταφυλιού (2,5-10 μg/ml) για 24 ώρες και tBHP (0.3 mM) για 30 λεπτά. (α) Τα ιστογράμματα που παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με το φθορισμό τους (10000 κύτταρα) όπως προκύπτουν από την κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση της GSH. Το FL2 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση του φθορισμού χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής αντιστοίχως. (β) Τα ιστογράμματα που παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με το φθορισμό τους (10000 κύτταρα) όπως προκύπτουν από την κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση των ROS. Το FL1 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση του φθορισμού χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής αντιστοίχως. Για την μέτρηση των ROS και της GSH, τα κύτταρα C2C12 επώαστηκαν με 10 mM DCF-DA και 40 mM mercury orange, αντίστοιχα, για 30 λεπτά στους 37°C. Τα κύτταρα στη συνέχεια πλύθηκαν, επαναδιαλύθηκαν σε PBS, και αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής, όπως περιγράφεται παραπάνω.



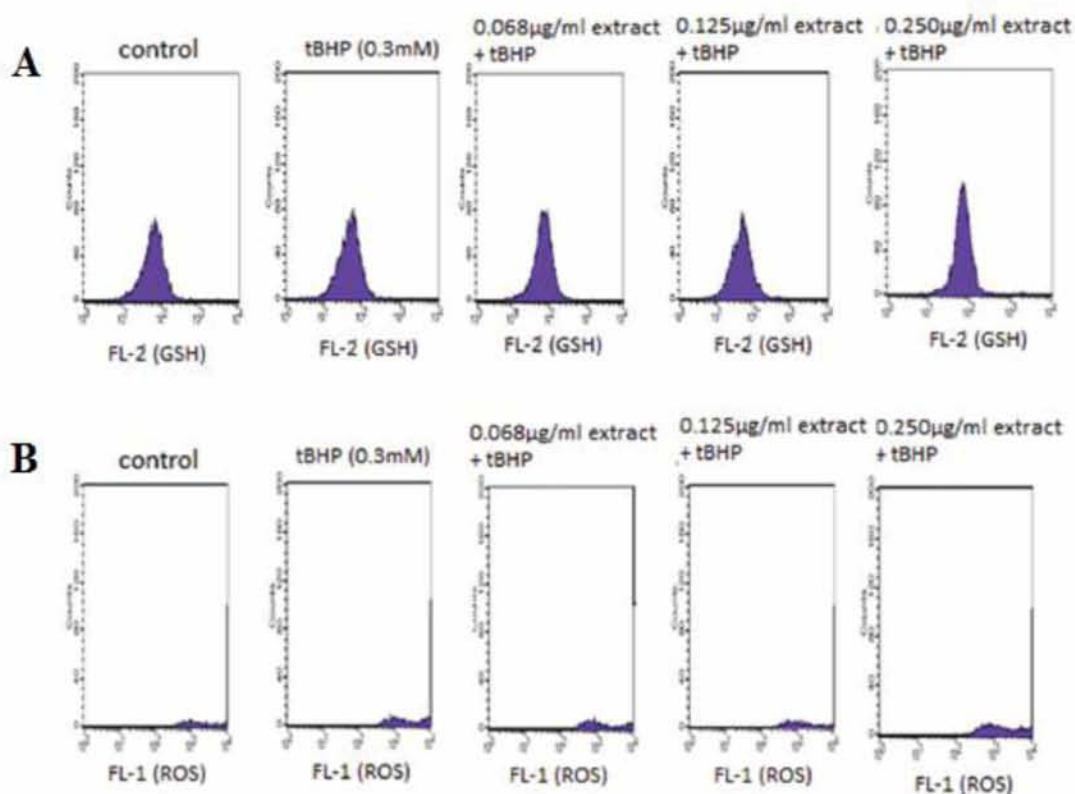
Εικόνα 29. Παρουσιάζεται η επίδραση της χορήγησης του εκχυλίσματος στεμφύλων στα επίπεδα των ROS, GSH, TBARS, και Πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Τα επίπεδα των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων εκτιμήθηκαν φασματοφωτομετρικά. Όλες οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. \*  $p < 0,05$ : στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα που χορηγήθηκε μόνο tBHP.

### 2.3.6. Προστατευτικές επιδράσεις του εκχυλίσματος στεμφύλων έναντι του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από το tBHP στα κύτταρα EA.hy926.

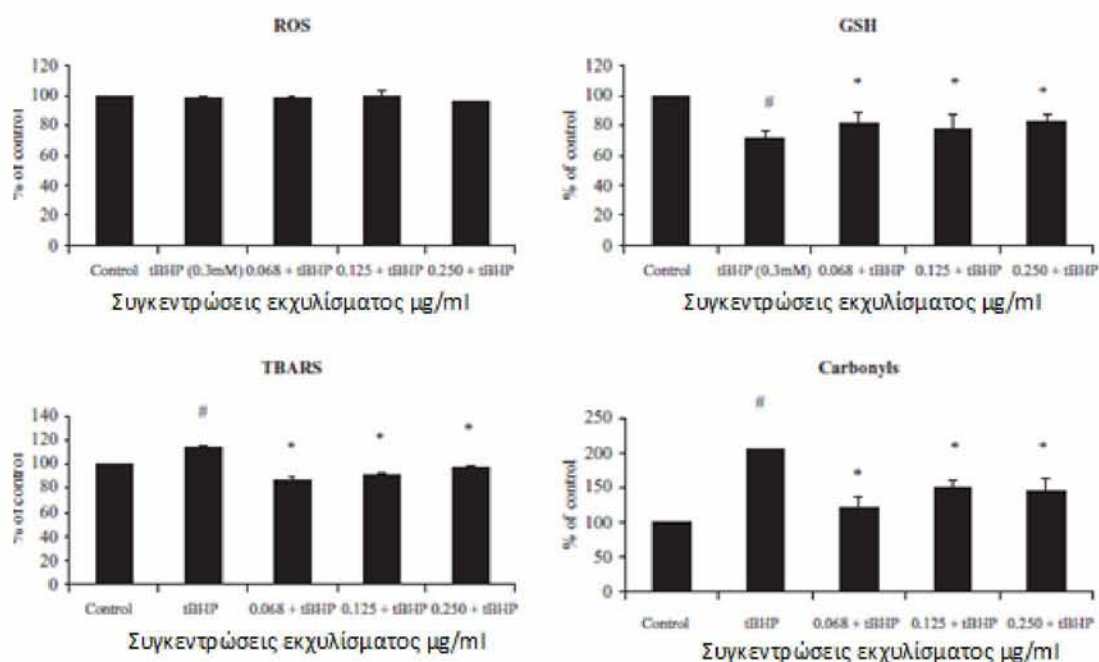
Τα ιστογράμματα της κυτταρομετρίας ροής που υποδεικνύουν τον αριθμό των κυττάρων σε σχέση με τα επίπεδα φθορισμού της DCF-DA ή της mercury orange που χρησιμοποιούνται για τη χρώση των ROS και GSH αντίστοιχα, για τα κύτταρα EA.hy926 μετά την χορήγηση μόνο του παράγοντα tBHP ή και με ακόλουθη ανάπτυξη των κυττάρων σε θρεπτικό μέσω που περιείχε εκχύλισμα στεμφύλων παρουσιάζονται στις εικόνες 30A και 30B αντίστοιχα. Σε αντίθεση σε κύτταρα



C2C12, το εκχύλισμα δεν επηρέασε τα επίπεδα των ROS στα κύτταρα EA.hy926 σε σύγκριση με τα κύτταρα που χορηγήθηκε μόνο ο tBHP (εικόνα 31). Ωστόσο, το εκχύλισμα στεμφύλων ανέστειλε σημαντικά την tBHP-επαγόμενη μείωση των επιπέδων της GSH κατά  $14,3 \pm 4,6$ ,  $10,1 \pm 5,2$ , και  $15,4 \pm 3,4\%$  στις συγκεντρώσεις 0,068, 0,125, και 0,250  $\mu\text{g/ml}$  (εικόνα 31). Επιπλέον, το εκχύλισμα ανέστειλε σημαντικά την tBHP-επαγόμενη αύξηση στα επίπεδα των TBARS κατά  $23,3 \pm 3,1$ ,  $20,1 \pm 1,6$ , και  $17,7 \pm 3,4\%$  στα 0,068, 0,125, 0,250 και  $\mu\text{g/ml}$  (εικόνα 31). Όπως και στα επίπεδα των TBARS, το εκχύλισμα ανέστειλε σημαντικά την tBHP-επαγόμενη αύξηση στα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων κατά  $41,5 \pm 8,3\%$ ,  $26,2 \pm 4,6\%$ , και  $28,30 \pm 7,9\%$  σε 0,068, 0,125, 0,250 και  $\mu\text{g/ml}$ , αντιστοίχως (εικόνα 31).



Εικόνα 30. Επίδραση της χορήγησης του tBHP μόνο του ή μετά την χορήγηση εκχυλίσματος στεμφύλων στους δείκτες οξειδωτικού στρες στα κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα μελετήθηκαν υπό τρεις διαφορετικές συνθήκες: υπό συνθήκες ελέγχου, υπό την χορήγηση του tBHP (0,3 mM) για 30 λεπτά, και κάτω από το συνδυασμό χορήγησης του εκχυλίσματος σταφυλιού (0,068-0,250 µg/ml) για 24 ώρες και tBHP (0,3 mM) για 30 λεπτά. (α) Τα ιστογράμματα που παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με το φθορισμό τους (10000 κύτταρα) όπως προκύπτουν από την κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση της GSH. Το FL2 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση του φθορισμού χρησιμοποιώντας 488 και 580 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής αντιστοίχως. (β) Τα ιστογράμματα που παρουσιάζουν τον αριθμό των κυττάρων σε συνάρτηση με το φθορισμό τους (10000 κύτταρα) όπως προκύπτουν από την κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση των ROS. Το FL1 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση του φθορισμού χρησιμοποιώντας 488 και 530 nm ως μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής αντιστοίχως. Για την μέτρηση των ROS και της GSH, τα κύτταρα C2C12 επώαστηκαν με 10 mM DCF-DA και 40 mM mercury orange, αντίστοιχα, για 30 λεπτά στους 37°C. Τα κύτταρα στη συνέχεια πλύθηκαν, επαναδιαλύθηκαν σε PBS, και αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας κυτταρομετρία ροής, όπως περιγράφεται παραπάνω.



Εικόνα 31. Παρουσιάζεται η επίδραση της χορήγησης του εκχυλίσματος στεμφύλων στα επίπεδα των ROS, GSH, TBARS, και πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Τα επίπεδα των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων εκτιμήθηκαν με φασματοφωτομετρικά. Όλες οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. \*  $p < 0,05$ : στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα κύτταρα που χορηγήθηκε μόνο tBHP.

## 2.4. Συζήτηση

Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε η πιθανή ενίσχυση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών μυϊκών και ενδοθηλιακών κυττάρων, έπειτα από την χορήγηση ενός εκχυλίσματος στεμφύλων σταφυλιού πλούσιο σε πολυφαινόλες, απουσία ή παρουσία ενός παράγοντα που προκαλεί οξειδωτικό στρες. Το εκχύλισμα στεμφύλων απομονώθηκε από την ελληνικά σταφύλια *Vitis vinifera* της τοπικής ποικιλίας

Μπατίκι Τυρνάβου. Σε μια προηγούμενη μελέτη, είχε προσδιοριστεί η πολυφαινολική του σύσταση. Το συγκεκριμένο εκχύλισμα έχειδειχθεί ότι κατέχει ισχυρές αντιοξειδωτικές ικανότητες *in vitro* (Veskoukis et al., 2012).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η χορήγηση του συγκεκριμένου εκχυλίσματος στεμφύλων χωρίς την παρουσία ενός οξειδωτικού παράγοντα σε μυϊκά κύτταρα ενίσχυσε την αντιοξειδωτική άμυνά τους. Συγκεκριμένα, υπήρξε μια δόσοεξαρτώμενη μείωση στα συνολικά επίπεδα των ROS εντός των μυϊκών κυττάρων. Το γεγονός αυτό υποστηρίχθηκε από τη μείωση των επιπέδων των TBARS, ενός δείκτη της λιπιδικής υπεροξειδωσης. Υπήρξε επίσης μείωση στην οξείδωση των πρωτεϊνών όπως υποδεικνύεται από τα μειωμένα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Επιπλέον, το εκχύλισμα στεμφύλων επάγει μια αύξηση των επιπέδων της GSH, ενός από τα πιο σημαντικά ενδογενή αντιοξειδωτικά μόρια (Quintana-Cabrera and Bolanos, 2013). Ως εκ τούτου, η αύξηση στα επίπεδα της GSH φαίνεται να είναι ένας από τους μοριακούς μηχανισμούς μέσω των οποίων το εκχύλισμα ασκεί αντιοξειδωτική δράση στα μυϊκά κύτταρα.

Είναι σημαντικό, το γεγονός πως τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ενίσχυση της αντιοξειδωτικής κατάστασης των μυϊκών κυττάρων από το εκχύλισμα στεμφύλων ήταν αποτελεσματική για την προστασία από τις δυσμενείς επιπτώσεις στα επίπεδα του οξειδωτικού στρες, που προκαλείται από παράγοντα tBHP. Έτσι, όταν ο tBHP προστέθηκε στα μυϊκά κύτταρα C2C12 μετά από την επεξεργασία τους με το εκχύλισμα στεμφύλων, υπήρξε σημαντική μείωση των ROS, των TBARS, και των επιπέδων των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σύγκριση με τα κύτταρα που προστέθηκε μόνο ο tBHP. Μελέτες *in vivo* έχουν επίσης δείξει ότι εκχυλίσματα στεμφύλων μπορούν να μειώνουν το οξειδωτικό στρες στους σκελετικούς μυς. Για παράδειγμα, η

χορήγηση εκχυλίσματος στεμφύλων μείωσε την υπεροξειδωση των σε σκελετικό μυ επίμυων (Pajuelo et al., 2012). Μια άλλη in vivo μελέτη έδειξε επίσης ότι το εκχύλισμα γιγάρτων σταφυλιού οδήγησε σε αύξηση της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων στους σκελετικούς μύς διαβητικών επιμύων (Ding et al., 2013). Επιπλέον, τα παρόντα αποτελέσματα έδειξαν ότι τα επίπεδα GSH ήταν σημαντικά υψηλότερα στα μυϊκά κύτταρα που κατεργάστηκαν με εκχύλισμα στεμφύλων πριν από τη χορήγηση του tBHP, σε σύγκριση με τα κύτταρα που χορηγήθηκε μόνο ο tBHP. Είναι ενδιαφέρον ότι, τα επίπεδα της γλουταθειόνης στα μυϊκά κύτταρα που αναπτύχθηκαν με το εκχύλισμα πριν την χορήγηση του tBHP ήταν ακόμη σημαντικά υψηλότερα από εκείνα των κυττάρων ελέγχου. Το εύρημα αυτό υπογραμμίζει το καθοριστικό ρόλο των αυξημένων επιπέδων γλουταθειόνης στην παρατηρούμενη αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος στεμφύλων στα μυϊκά κύτταρα. Αν και αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα εκχυλίσματα σταφυλιού προστατεύουν από το οξειδωτικό στρες, αυξάνοντας την GSH σε καρδιακό μυ και άλλους ιστούς, αυτή είναι η πρώτη εργασία σε μυϊκά κύτταρα C2C12 (Orhan et al., 2006; Filip et al., 2011).

Επιπλέον, εξετάστηκε η πιθανή αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος στεμφύλων τόσο παρουσία όσο και απουσία ενός οξειδωτικού παράγοντα (tBHP) σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Στα ενδοθηλιακά EA.hy926 κύτταρα, η χορήγηση του εκχυλίσματος στεμφύλων χωρίς την προσθήκη του οξειδωτικού παράγοντα tBHP ενίσχυσε τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων. Αν και αυτό ήταν παρόμοιο με αυτό που παρατηρήθηκε στα μυϊκά κύτταρα, υπήρχαν κάποιες διαφορές. Όπως και στα μυϊκά κύτταρα, το εκχύλισμα σταφυλιού μείωσε σημαντικά τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, υποδεικνύοντας

μία μείωση στην οξειδωση των πρωτεϊνών. Κι εδώ πάλι φαίνεται ότι η προστατευτική δράση του εκχυλίσματος μπορεί να αποδοθεί στη σημαντική αύξηση των επιπέδων της GSH σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου. Ωστόσο, στα κύτταρα EA.hy926, σε αντίθεση με τα μυϊκά κύτταρα, το εκχύλισμα στεμφύλων δεν μείωσε σημαντικά τα επίπεδα των ROS και των TBARS. Αυτή η μικρότερη δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να οφείλεται στις μικρότερες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκαν στα κύτταρα EA.hy926 σε σύγκριση με τα C2C12 κύτταρα.

Επιπλέον, στα ενδοθηλιακά EA.hy926 κύτταρα, η χορήγηση του εκχυλίσματος στεμφύλων προστατεύει τα κύτταρα από το tBHP-επαγόμενο οξειδωτικό στρες όπως συνέβη και στα μυϊκά κύτταρα. Συγκεκριμένα, στα EA.hy926 κύτταρα η χορήγηση του εκχυλίσματος στεμφύλων ανέστειλε σημαντικά την tBHP-επαγόμενη αύξηση των TBARS και των πρωτεϊνικών καρβονυλίων. Επίσης, στα κύτταρα EA.hy926, παρόμοια με τα μυϊκά κύτταρα, η επαγόμενη από το εκχύλισμα αύξηση των επιπέδων της GSH μπορεί να ευθύνεται, εν μέρει τουλάχιστον, για τη μείωση του tBHP-επαγόμενου οξειδωτικού στρες. Ωστόσο, η αύξηση της GSH που επάγεται από το εκχύλισμα στα κύτταρα EA.hy926 ήταν χαμηλότερη από ότι στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Αυτή η διαφορά μπορεί να εξηγηθεί από τις μικρότερες συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκαν στα EA.hy926 κύτταρα σε σύγκριση με τα κύτταρα C2C12. Επιπλέον, το εκχύλισμα στεμφύλων μπορεί να ενισχύσει την αντιοξειδωτική κατάσταση μέσω άλλων μηχανισμών, πέρα από την αύξηση της GSH, και αυτό μπορεί να διαφέρει μεταξύ των δύο κυτταρικών σειρών. Είναι ενδιαφέρον πως μια κλινική μελέτη έδειξε ότι εκχύλισμα γιγάρτων σταφυλιού αύξησε τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης πλάσματος σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 με υψηλό καρδιαγγειακό ρίσκο (Kar et al., 2009). Έτσι,

με βάση τα αποτελέσματα μπορεί να προταθεί η χρήση των εκχυλισμάτων στεμφύλων για την πρόληψη του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από βλάβη στα ενδοθηλιακά κύτταρα και συνεπώς στο καρδιαγγειακό σύστημα. Μελέτες έχουν δείξει ότι χορήγηση εκχυλισμάτων σταφυλιού δρούσε προστατευτικά σε διάφορες καρδιαγγειακές δυσλειτουργίες (Bagchi et al., 2003). Επιπλέον, σε άλλες μελέτες, εκχυλίσματα γιγάρτων σταφυλιού ανέστειλαν τον παράγοντα νέκρωσης όγκων-α (TNF-α) που ευθύνεται για την οξείδωση του DNA σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφαλίου λώρου (HUVEC), ενώ τα εκχυλίσματα φλούδας και σπόρων σταφυλιών ανέστειλαν την αύξηση των ROS που προκαλείται από τη γλυκόζη σε πρόδρομα ενδοθηλιακά κύτταρα (Chao et al., 2011; Felice et al., 2012). Οι Feng et al., (2010) επίσης ανέφεραν ότι σε ενδοθηλιακά κύτταρα της σειράς HUVEC, το εκχύλισμα της φλούδας του σταφυλιού ανέστελλε την επαγόμενη αύξηση των ROS από το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ) μέσω της ενεργοποίησης του μονοπατιού της PI3-kinase/AKT.

Η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος στεμφύλων σταφυλιού αποδίδεται σε μεγάλο βαθμό στο υψηλό πολυφαινολικό περιεχόμενό του. Έτσι, η πολυφαινολική σύνθεση του εκχυλίσματος στεμφύλων εκτιμήθηκε και εντοπίστηκαν διάφορες κατηγορίες πολυφαινολών όπως φλαβαν-3-όλες, φλαβονόλες, ανθοκυανίνες, ανθοκυανίνες, και φαινολικά οξέα. Όλες αυτές οι πολυφαινόλες που εντοπίζονται στο συγκεκριμένο εκχύλισμα στεμφύλων έχουν αντιοξειδωτική δράση (Hosu et al., 2013; Hribar et al., 2014). Ειδικότερα, οι φλαβονόλες, κατεχίνη και επικατεχίνη, έχουν βρεθεί να είναι μεταξύ των φλαβονοειδών με την πιο ισχυρή ικανότητα εξουδετέρωσης ελευθέρων ριζών. Η δραστηρότητά τους έναντι των ελεύθερων ριζών αποδίδεται κυρίως στην χημική τους δομή, ιδιαίτερα στους δύο δακτυλίους

βενζολίου, Α-δακτυλίου και Β-δακτυλίου (Sang et al., 2014). Η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονολών αυξάνεται περαιτέρω με την παρουσία της τρι-υδροξυ δομής του D δακτυλίου στη γαλλική-3-επιγαλλοκατεχίνη (EGCG) (Singh et al., 2011). Η κερκετίνη έχει τον ίδιο αριθμό ομάδων υδροξυλίου στις ίδιες θέσεις όπως και η κατεχίνη αλλά επίσης περιέχει τον 2,3-διπλό δεσμό στον δακτύλιο C και την 4-όξο ομάδα. Το πλεονέκτημα αυτό προσδίδει μια δομή με ενισχυμένη αντιοξειδωτική δράση σε σύγκριση με το κορεσμένο ετεροκυκλικό δακτύλιο της κατεχίνης. Οι ανθοκυανίνες, και ειδικά η κυανιδίνη και η δελφινιδίνη, έχουν επίσης αναφερθεί για την ισχυρή ικανότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών σε πολλές *in vitro* μελέτες (Kahkonen and Heinonen, 2003). Έχει επίσης αναφερθεί ότι οι ανθοκυανιδίνες, όπως κυανιδίνη με τον κεντρικό ακόρεστο δακτύλιο ανθοκυανιδίνης C, έχουν περίπου την ίδια αντιοξειδωτική δράση με την κερκετίνη (Rice-Evans et al., 1996). Η βασική δραστική αντιοξειδωτική ουσία των ανθοκυανινών μπορεί να αποδοθεί πάλι στην αναγωγική ισχύς της ο-διυδροξυ δομής στο δακτύλιο B, όπως στην κυανιδίνη και στην κερκετίνη (Rice-Evans et al., 1996). Τέλος, η δραστηριότητα εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών των πολυφαινολικών οξέων όπως το γαλλικό οξύ αποδίδεται κυρίως στις τρεις διαθέσιμες υδροξυλικές ομάδες (Rice-Evans et al., 1996). Εκτός από την άμεση δράση τους έναντι των ελευθέρων ριζών, οι πολυφαινόλες ασκούν αντιοξειδωτική δράση μέσω της διαφοροποίησης των μοριακών μηχανισμών των κυττάρων. Για παράδειγμα, η φλαβανόλη EGCG έχει δείχθει ότι μειώνει την κυτταροτοξικότητα που προκαλείται από το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και αυξάνει τα επίπεδα ενζύμων που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες, με αποτέλεσμα μια αυξημένη κυτταρική περιεκτικότητα σε ανηγμένη γλουταθειόνη στα HepG2 κύτταρα (Murakami et al., 2002). Επιπλέον, η κερκετίνη προστατεύει τα ανθρώπινα κερατινοκύτταρα HaCaT από τις υπεριώδεις ακτινοβολίες που προκαλούν οξειδωτικό



στρες μέσω της αυξημένης έκφρασης των αντιοξειδωτικών γονιδίων που προκαλείται από τον μεταγραφικό παράγοντα Nrf2 (Kimura et al., 2009). Επιπλέον, οι ανθοκυανιδίνες, κυανιδίνη και δελφινιδίνη, έχουνδειχθεί ότι εμποδίζουν το σχηματισμό των ROS σε ανθρώπινα αορτικά λεία μυϊκά αγγειακά κύτταρα μέσω της αναστολή της πρωτεϊνικής κινάσης που ενεργοποιείται από μιτογόνο (p38 MAPK) και του μονοπατιού του N-τελικού άκρου της κινάσης c-Jun (Oak et al., 2006). Τέλος, το γαλλικό οξύ έχει αναφερθεί να προστατεύσει τα κύτταρα φεοχρωματοκυττώματος αρουραίου PC12 από επαγόμενο οξειδωτικό στρες από καϊνικό οξύ με τη μείωση των επιπέδων της COX-2 και της p38 MAPK (Huang et al., 2012).

Συμπερασματικά, τα παρόντα αποτελέσματα δείχνουν ότι η χορήγηση εκχυλίσματος στεμφύλων μπορεί να ενισχύσει τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των μυϊκών και ενδοθηλιακών κυττάρων τόσο με την παρουσία όσο και την απουσία ενός παράγοντα που προκαλεί οξειδωτικό στρες. Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι το εκχύλισμα στεμφύλων μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως συμπλήρωμα διατροφής ώστε να μειωθούν οι δυσμενείς επιπτώσεις που προκαλούνται από το οξειδωτικό στρες που προκαλείται σε αυτά τα κύτταρα. Αξίζει επίσης να αναφέρουμε ότι σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές η αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος σταφυλίου παρατηρήθηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0,068 έως 0,250  $\mu\text{g/ml}$  για τα EA.hy926 και 2,5 έως 10  $\mu\text{g/ml}$  για τα κύτταρα C2C12), ενώ, σε πολλές μελέτες, υψηλότερες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται δεν έχουν φυσιολογικό νόημα ή παρουσιάζουν τοξικότητα.

### ***ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3***

***Προσδιορισμός της επίδρασης του εκχυλίσματος  
στεμφύλων σταφυλιού της ποικιλίας Μπατίκι  
Τυρνάβου στην έκφραση και δραστικότητα  
αντιοξειδωτικών ενζύμων στα μυϊκά κύτταρα C2C12  
και στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926***

### 3.1. Γενικά

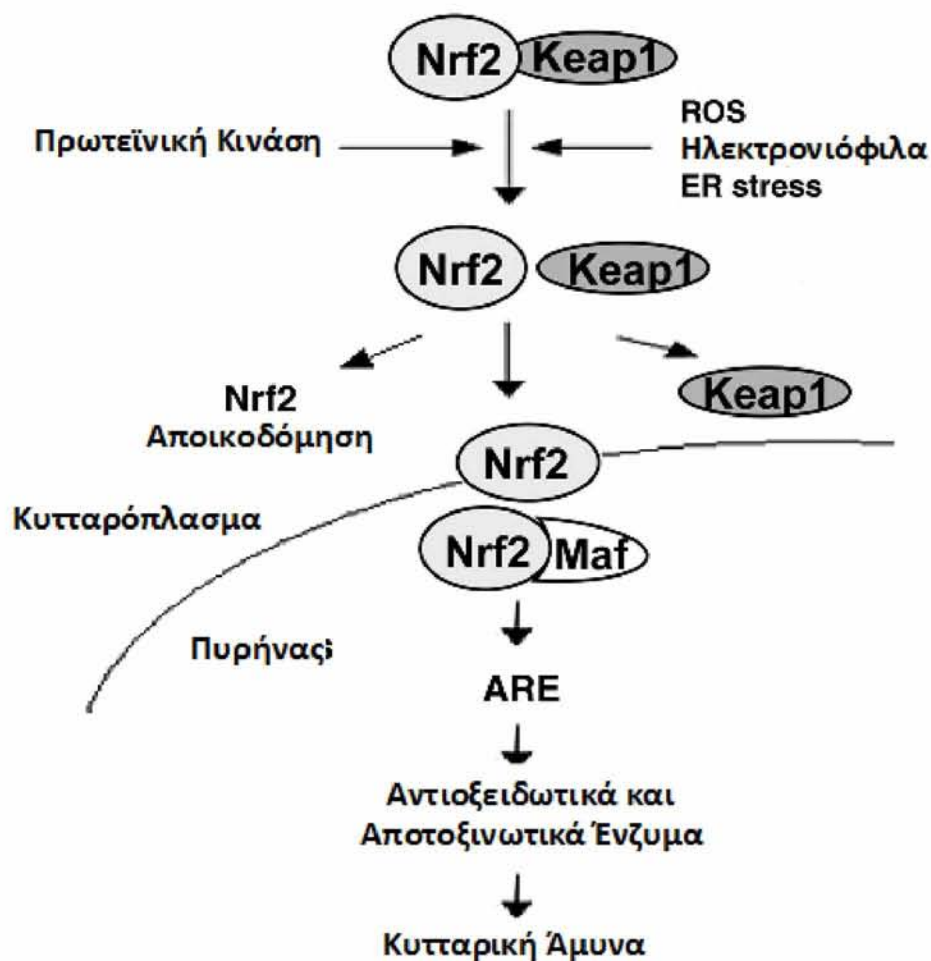
Οι ελεύθερες ρίζες σε έναν οργανισμό μπορεί να δημιουργηθούν εξαιτίας διαφόρων παραγόντων ενδογενών και εξωγενών όπως ο αερόβιος μεταβολισμός διάφορα ξενοβιοτικά μόρια, φάρμακα, βαρέα μέταλλα και ιονίζουσα και υπεριώδης ακτινοβολία. Η παραγωγή των ROS οδηγεί στην δημιουργία ηλεκτρονιόφιλων μορίων και καταλήγει στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες. Όταν η παραγωγή ROS είναι μεγαλύτερη από την κυτταρική αντιοξειδωτική ικανότητα, μπορούν να διεγερθούν αλυσιδωτές αντιδράσεις ελευθέρων ριζών οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να καταστρέψουν, οξειδώνοντας κυτταρικά βιομόρια όπως οι πρωτεΐνες, τα λιπίδια και το DNA. Εκτεταμένη οξειδωτική βλάβη βιομορίων έχει συσχετιστεί με ασθένειες (Breimer et al., 1990; Meneghini et al., 1997). Οι ROS εμπλέκονται σε περισσότερες από 100 ασθένειες όπως η αθηροσκλήρωση, ο καρκίνος, ο διαβήτης και η διαταραχή της επαναιμάτωσης (Halliwell & Gutteridge, 1990). Επομένως, τα κύτταρα πρέπει συνεχώς να ελέγχουν τα επίπεδα των ROS και να προλαμβάνουν με κάποιο τρόπο τη αύξηση της συγκέντρωσής τους.

Έχοντας εξελιχθεί σε αερόβιο περιβάλλον, τα περισσότερα κύτταρα έχουν αποκτήσει περίπλοκους μηχανισμούς ενζυμικούς και μη ενζυμικούς για να αντιμετωπίσουν την επαγόμενη από ROS τοξικότητα (Valko et al., 2007). Έχουν εξελιχθεί οικογένειες γονιδίων ενζύμων με αντιοξειδωτική και αντιτοξική δράση αλλά και μεταγραφικοί παράγοντες που ελέγχουν την έκφρασή τους. Ένας τέτοιος μεταγραφικός παράγοντας με σημαντικό ρόλο στην έκφραση αντιοξειδωτικών ενζύμων είναι ο Nrf2. Ο Nrf2 μπορεί να ενεργοποιήσει την έκφραση μιας πληθώρας γονιδίων ανάλογα με τον ιστό και την οξειδοαναγωγική κατάσταση του κυττάρου. Οι οικογένειες των ενζύμων τα οποία επάγονται έχουν ταξινομηθεί σε διάφορες

κατηγορίες: (α) ξενοβιοτικά ένζυμα μεταβολισμού της φάσης II [π.χ. τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GSTs), UDP-γλυκουρονυλτρανσφεράση (UDPGTs), NAD(P)H:κινόνη οξειδορεδοκτάσης (NQO1), υδρολάση εποξειδίου (EH), αλδεϋδική ρεδοκτάση της αφλατοξίνης B1 (AFAR), οξυγενάση της αίμης 1 (HO-1), (β) αντιοξειδωτικά ένζυμα [π.χ. συνθετάση της γ-γλουταμυλ-κυστεΐνης (g-GCS), υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), καταλάση (CAT), αναγωγή της γλουταθειόνης (GR), αναγωγή της θειορεδοξίνης (TR)], (γ) μοριακοί συνοδοί/ πρωτεοσωμικά συστήματα, (δ) ένζυμα επιδιόρθωσης DNA και (ε) αντι-φλεγμονώδεις πρωτεΐνες (π.χ. HO-1, φερριτίνη) (Kwak et al., 2003; Hayes & McLellan, 1999; Talalay et al., 2003; Li et al., 2002; Kelly et al., 2000).

Έχει αναφερθεί και προηγουμένως πως η συμπληρωματική λήψη αντιοξειδωτικών μέσω της διατροφής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μειώσει τις επιβλαβείς επιδράσεις των ελευθέρων ριζών στην ανθρώπινη υγεία (Matthaiou et al., 2014; Samaras et al., 2014; Kerasioti et al., 2012). Μερικές από τις πιο γνωστές τροφές που αποτελούν πηγή αντιοξειδωτικών είναι τα σταφύλια και το κρασί (Bagchi et al., 2014). Στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας έχουν πραγματοποιηθεί διάφορες μελέτες σχετικά με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των σταφυλιών, τα οποία οφείλονται κυρίως στο πολυφαινολικό του περιεχόμενο (Apostolou et al., 2013; Spanou et al., 2011; Stagos et al., 2005; 2006; 2007). Στην μελέτη που προηγήθηκε, δείχθηκε ότι ένα εκχύλισμα στεμφύλων σταφυλιών (GPE) πλούσιο σε πολυφαινόλες που προέρχονται από τις φλούδες, τους σπόρους και τα κοτσάνια, ένα υποπροϊόν της διαδικασίας οινοποίησης, μείωσε το οξειδωτικό στρες σε μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα κυρίως μέσω της αύξησης της γλουταθειόνης (GSH). Έτσι, στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκαν τα αποτελέσματα της χορήγησης του εκχυλίσματος στεμφύλων, σταφυλιού τις τοπικής ποικιλίας

Μπατίκι Τυρνάβου στα επίπεδα και την δραστικότητα ενζύμων τα οποία είναι ζωτικής σημασίας για τον μεταβολισμό GSH, όπως η γάμμα-γλουταμυλκυστεινική συνθετάση (GCS), και η S-τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), σε ενδοθηλιακά και μυϊκά κύτταρα. Επιπλέον, οι επιδράσεις του εκχυλίσματος στεμφύλων σε άλλα κρίσιμα αντιοξειδωτικά ένζυμα, όπως η καταλάση (CAT), η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD) και η οξυγενάση της αίμης 1 (HO-1) εξετάστηκαν σε ενδοθηλιακά και μυϊκά κύτταρα. Η έρευνα των αποτελεσμάτων της χορήγησης του εκχυλίσματος στεμφύλων στα αντιοξειδωτικά ένζυμα σε κυτταρικό επίπεδο μπορεί να βοηθήσει στην διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών μέσω των οποίων ασκεί την αντιοξειδωτική δράση του. Η κατανόηση αυτών των μηχανισμών παρέχει πολύτιμη γνώση που μπορεί να βοηθήσουν στην παρασκευή φυτικών εκχυλισμάτων με στόχο να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρώματα διατροφής.



Εικόνα 32. Μονοπάτια μεταγωγής σήματος υπεύθυνα για την ενεργοποίηση του μονοπατιού Nrf2/ARE.

### 3.2. Υλικά και Μέθοδοι

#### 3.2.1. Προετοιμασία του εκχυλίσματος

Το εκχύλισμα στεμφύλων σταφυλιού που εξετάστηκε ανήκε στην ποικιλία Μπατίκι Τυρνάβου (μια ερυθρή ποικιλία σταφυλιών που καλλιεργούνται στην Κεντρική Ελλάδα) του γένους *Vitis vinifera*. Η απομόνωση του εκχυλίσματος διεξήχθη όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Εν συντομία, η πρώτη ύλη αποξηράθηκε σε ένα σκιερό και καλά αεριζόμενο περιβάλλον και εκχυλίστηκε χρησιμοποιώντας αιθανόλη (96%) στους 50 °C για 4 h. Μετά από διήθηση, ο διαλύτης εξατμίστηκε υπό

ελαττωμένη πίεση, και το υπόλειμμα (δηλαδή το εκχύλισμα) διατηρήθηκε στους -20 °C μέχρι την περαιτέρω χρήση.

Η πολυφαινολική σύνθεση του εκχυλίσματος προσδιορίστηκε με τη χρήση της μεθόδου υγρής χρωματογραφίας / φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης (LC-HRMS) όπως έχει αναφερθεί προηγουμένως (Κεφάλαιο 2). Έτσι, το εκχύλισμα αποτελείται από φλαβαν-3-όλες (κατεχίνη και επικατεχίνη), ανθοκυανίνες, (κυανιδίνη, μαλβιδίνη, δελφινιδίνη και πετουνιδίνη), ανθοκυανίνες (μυρτιλλίνη, κουμαρίνη, οενίνη και 3-O-γλυκοσίδιο-πεονιδίνης) και φλαβονόλες (κερκετίνη), φαινολικά οξέα (γαλλικό οξύ και καftarικό οξύ). Επιπλέον, η συνολική περιεκτικότητα σε πολυφαινολικές (TPC) του εκχυλίσματος εκτιμήθηκε και βρέθηκε ίση με 648 mg γαλλικού οξέος ανά g εκχυλίσματος.

### 3.2.2. Συνθήκες καλλιέργειας κυττάρων

Τα μυϊκά κύτταρα C2C12 ήταν δώρο από τον καθηγητή Κουτσιλιέρη (Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα) και τα κύτταρα EA.hy926 από τον καθηγητή Κουκούλη (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα). Όλα τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τροποποιημένο θρεπτικό μέσο Dulbecco Eagle (DMEM), που περιέχει 10% (v/v) εμβρυϊκό βόειο ορό (FBS), 2 mM L-γλουταμίνη, 100 U/ml πενικιλίνης και 100 U/ml στρεπτομυκίνης (όλα από την Gibco, Paisley, UK) σε πλαστικές φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων μιας χρήσεως στους 37 °C σε 5% διοξείδιο του άνθρακα.

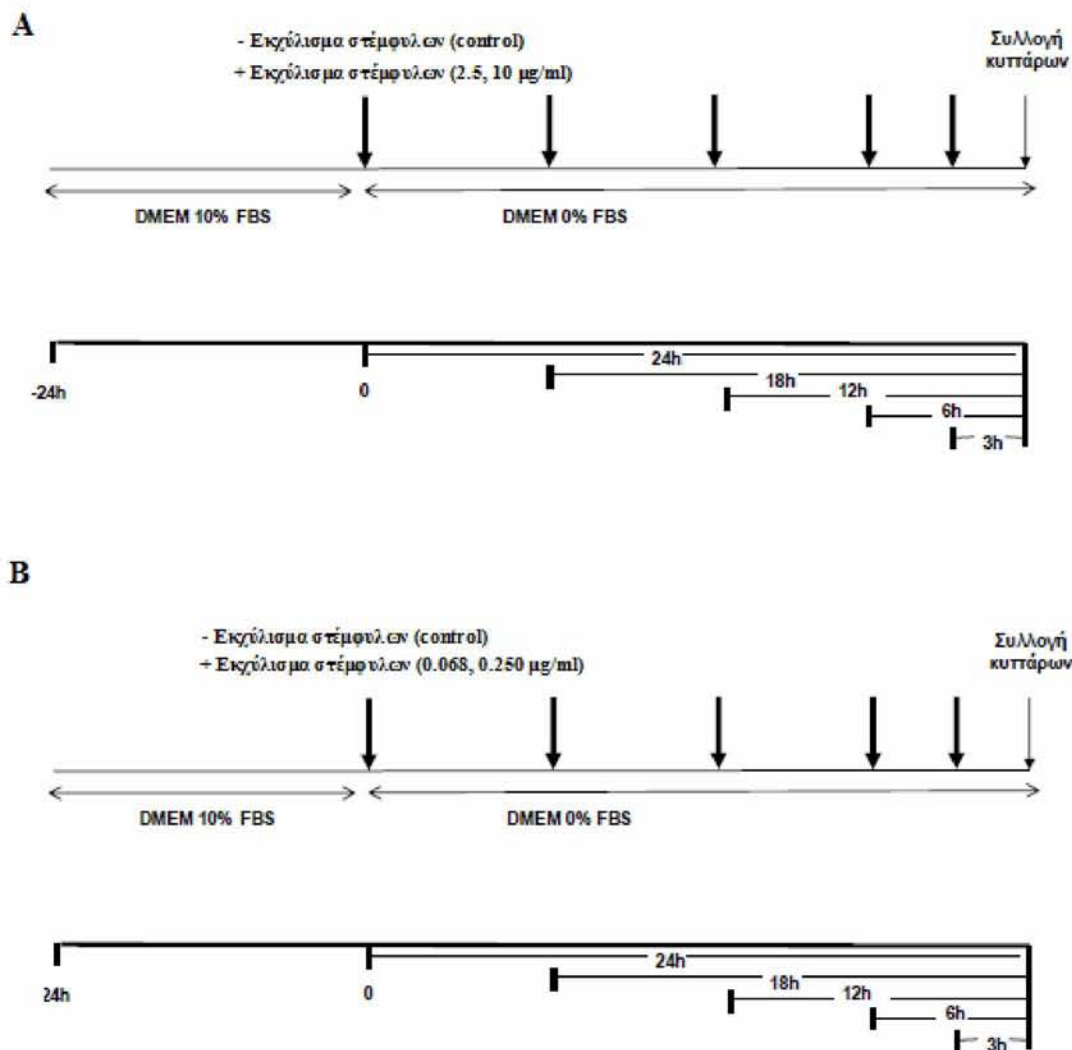
### 3.2.3. Κατεργασία των κυττάρων με εκχύλισμα στεμφύλων

Τα κύτταρα C2C12 και EA.hy926 καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας και επωάστηκαν για 24 h. Το θρεπτικό μέσο στη συνέχεια απομακρύνθηκε και αντικαταστάθηκε με μέσο χωρίς FBS που περιέχει εκχύλισμα στεμφύλων σε μη-κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις (2,5 και 10  $\mu\text{g/ml}$  για τα κύτταρα C2C12 και 0,068 και 4,250  $\mu\text{g/ml}$  για τα κύτταρα EA.hy926) και ακολούθησε επώαση για 3, 6, 12, 18 και 24 h (εικόνα 33). Στην προηγούμενη μελέτη, αποδείχθηκε ότι αυτές οι συγκεντρώσεις ήταν μη-κυτταροτοξικές για τα κύτταρα C2C12 και EA.hy926. Μη επεξεργασμένα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες.

Μετά τη χορήγηση του εκχυλίσματος, τα κύτταρα λύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα ραδιο-ανοσοκαταβύθισης [ρυθμιστικό διάλυμα RIPA, 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,25% SDS, 0,25% δεοξυχολικό νάτριο και 1 mM αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA), pH 8,0] που περιείχε αναστολείς πρωτεασών (Complete <sup>TM</sup> αναστολείς mini πρωτεασών, Roche, Basel, Switzerland) για την παρασκευή του ολικού κυττοσολικού κυτταρολύματος. Τα προϊόντα λύσης των κυττάρων στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στα 16250 g για 20 min στους 4 °C. Το υπερκείμενο συλλέχθηκε, και η ποσότητα της πρωτεΐνης, στη συνέχεια προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Bradford (Sigma-Aldrich Ltd, Μόναχο, Γερμανία). Για την παρασκευή του πυρηνικού κυτταρολύματος, τα κύτταρα λύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα λύσης [10 mM 4-(2-υδροξυαιθυλο)-1-πιπεραζινοαιθανο σουλφονικό οξύ (HEPES) - υδροξείδιο του καλίου (KOH) pH 7,9, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM χλωριούχο κάλιο (KCl), 0,5 mM διθειοθρεϊτόλη (DTT) και 0,5% NP-40] στο οποίο προστίθενται οι αναστολείς πρωτεασών (Complete <sup>TM</sup> mini αναστολείς πρωτεασών, Roche). Τα δείγματα στη συνέχεια επωάζονται στον πάγο για 20 λεπτά και ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 16250 g στους 4 °C για 5 λεπτά. Το



υπερκείμενο συλλέχθηκε, και η ποσότητα της πρωτεΐνης στη συνέχεια προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Bradford (Sigma-Aldrich Ltd.). Τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -80 °C μέχρι την περαιτέρω ανάλυση.



Εικόνα 33. Πειραματικός σχεδιασμός για την μελέτη της επίδρασης του εκχυλίσματος στεμφύλων στην πρωτεϊνική έκφραση της υπεροξειδικής δισμουτάσης-1 (SOD-1), της καταλάσης (CAT), της οξυγενάσης της αίμης (HO-1) και της συνθετάσης της γλουταμυλικής κυστεΐνης (GCS) καθώς και της ενζυμικής δράσης της καταλάσης (CAT), της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) και της τρανσφεράσης της γλουταθειόνης(GST) στα A) μυϊκά κύτταρα C2C12 και στα B) ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επωάζονται για 24 h σε θρεπτικό υλικό DMEM εμπλουτισμένο με 10% σε ορό FBS. Το φαρδύ βέλος συμβολίζει την αλλαγή υλικού σε DMEM απουσία ορού FBS και την προσθήκη του εκχυλίσματος στεμφύλων (2,5 και 10  $\mu\text{g/ml}$  για τα C2C12 και 0,068 και 0,250  $\mu\text{g/ml}$  για τα EA.hy926). Το λεπτό βέλος συμβολίζει την ολοκλήρωση των πειραμάτων και τη συλλογή των κυττάρων. Τα μεγάλα βέλη συμβολίζουν τη χορήγηση του εκχυλίσματος.

### **3.2.4. Ανάλυση Western blot για την μελέτη των επιπέδων των SOD, HO-1, CAT και GCS πρωτεϊνών**

Προκειμένου να μετρηθούν τα επίπεδα έκφρασης των SOD, HO-1, CAT και GCS, χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση στυπώματος Western. Ειδικότερα, κυτοσολικό κυτταρόλυμα που περιείχε 50 µg πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των επιπέδων έκφρασης των SOD, HO-1 και CAT, ενώ το πυρηνικό κυτταρόλυμα που περιέχει 30-50 µg πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των επιπέδων της GCS. Τα κυτταρολύματα διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση πηκτής θειικού πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE) χρησιμοποιώντας πηκτή πολυακρυλαμιδίου 8%. Οι πρωτεΐνες στη συνέχεια μεταφέρθηκαν πάνω σε μεμβράνες διφθοριούχου πολυβινυλιδενίου (PVDF) (Millipore, Bedford, MA, USA). Οι μεμβράνες επώαστηκαν για μία νύχτα με 5% άπαχο γάλα σε 13 mM Tris/ 150 mM NaCl, pH 7.5, που περιέχει 0.2% Tween-20. Στη συνέχεια στις μεμβράνες ανιχνεύτηκαν οι διάφορες πρωτεΐνες χρησιμοποιώντας πολυκλωνικό αντίσωμα goat anti-human SOD-1 (1: 1600, Cat no. sc-8634.) ή πολυκλωνικό αντίσωμα rabbit anti-human GCS (1: 1600, Cat. no. sc-28965), και τα δύο από την εταιρία Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA, ή πολυκλωνικό αντίσωμα goat anti-human HO-1 (1: 1400, Cat. no. AF3776) ή πολυκλωνικό αντίσωμα goat anti-human CAT (1: 1400, Cat. no. AF3398), από την εταιρία R & D Systems, Minneapolis, MN, USA, πρωτογενή αντισώματα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Οι μεμβράνες στη συνέχεια επώαστηκαν με δευτερογενές πολυκλωνικό αντίσωμα goat anti-rabbit (1:5000, Cat. no. 31462), ή πολυκλωνικό αντίσωμα donkey anti-goat (1:3000, Cat. no. PA1-28659), από την εταιρία Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου. Όλες οι μεμβράνες εκ νέου ανιχνεύθηκαν με πολυκλωνικό αντίσωμα rabbit 4anti-

human GAPDH (1: 1000, cat. no. PA1-988, Thermo Scientific) για την κανονικοποίηση των δεδομένων. Η οπτική πυκνότητα των ζωνών πρωτεΐνης μετρήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό της Alpha View ποσοτικοποίησης (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA). Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε 3 φορές.

### 3.2.5. Προσδιορισμός της δραστηριότητας CAT

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της καταλάσης CAT στο κυτοσολικό κυτταρόλυμα διεξήχθη με βάση την μέθοδο που περιγράφεται στην μελέτη του Aebi (1984). Πιο αναλυτικά η αντίδραση πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 3 ml στο οποίο περιέχονται 150  $\mu$ l κυτταροπλασματικού αιωρήματος και 2845  $\mu$ l 67 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών καλίου και νατρίου (pH 7,4). Τα δείγματα επωάζονται για 10 min στους 37 °C. Πέντε  $\mu$ l από διάλυμα  $H_2O_2$  30% w/v προστίθενται στα δείγματα και αμέσως μετράται η μεταβολή της οπτικής απορρόφηση στα 240 nm (UV) για 1,5 min. Η δραστηριότητα του ενζύμου φαίνεται ως η μείωση της αρχικής οπτικής απορρόφησης που έχουν τα δείγματα αμέσως μετά την προσθήκη του  $H_2O_2$ . Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με αέρα. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μεταβολή της απορρόφησης βρίσκεται στο γραμμικό κομμάτι της αντίδρασης της CAT με το υπόστρωμα ( $H_2O_2$ ). Η δραστηριότητα της καταλάσης υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας του  $H_2O_2$ .

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τα Unit ( $\mu$ mol/min) της CAT του δείγματος ανά mg της πρωτεΐνης του δείγματος. Η μέτρηση απαιτεί >30 $\mu$ g απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$U \text{ CAT/ mg πρωτεΐνης} = \frac{(\Delta \text{Αδείγματος/ min/40}) \times 20 \times 1000}{C\delta}$$

ΑΔείγματος/ min: Η μέση τιμή της μεταβολής της απορρόφησης ανά min.

$\epsilon_{240} \text{ H}_2\text{O}_2$  ( $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ): 40 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Τιμή 20: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος (Vτελ.αντίδρασης/  $\mu\text{l}$  αιωρήματος [3000  $\mu\text{l}$  /150  $\mu\text{l}$ ]).

Τιμή 1000: Για την μετατροπή  $\text{mol/l}$  σε  $\mu\text{mol/ml}$ .

Cδ: Η συγκέντρωση  $\text{mg/ml}$  της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

### 3.2.6. Προσδιορισμός της δραστηριότητας της GST

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της GST στο κυτοσολικό κυτταρόλυμα βασίστηκε στη μέθοδο των Habig et al. (1974). Πιο αναλυτικά, αναμιγνύονται 920  $\mu\text{l}$  ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών (100 mM, pH 7,4) με 50  $\mu\text{l}$  GSH (1 mM) και 20  $\mu\text{l}$  CDNB και τα δείγματα επωάζονται για 5 min στους 30 °C. Στη συνέχεια ακολουθεί προσθήκη 10  $\mu\text{l}$  του κυτοσολικού κυτταρολύματος και μέτρηση της μεταβολής της απορρόφησης στα 340 nm για 5 min. Τα δείγματα που δεν περιέχουν το κυτοσολικό κυτταρόλυμα αποτελούν το τυφλό. Ο μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου πραγματοποιείται με το τυφλό. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μεταβολή της απορρόφησης βρίσκεται στο γραμμικό κομμάτι της αντίδρασης της GST με το υπόστρωμα (CDNB). Η δραστηριότητα της GST υπολογίζεται με βάση τον συντελεστή μοριακής απορροφητικότητας του CDNB.

Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τα Unit της GST του δείγματος ανά mg της πρωτεΐνης του δείγματος. Η μέτρηση απαιτεί >10μg απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα. Οι υπολογισμοί γίνονται με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$U \text{ GST/ mg πρωτεΐνης} = \frac{(\Delta A_{\text{δείγματος/min}} / 0.0096) \times 100}{C\delta}$$

$\Delta A_{\text{δείγματος/min}}$ : Η μέση τιμή της μεταβολής της απορρόφησης ανά min.

$\epsilon_{240\text{CDNB}}$  ( $\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ): 0.0096 είναι ο συντελεστής μοριακής απόσβεσης του CDBN.

Τιμή 100: Ο συντελεστής αραίωσης του αιωρήματος (Vτελ.αντίδρασης/  $\mu\text{l}$  αιωρήματος [1000  $\mu\text{l}$ /10  $\mu\text{l}$ ]).

C $\delta$ : Η συγκέντρωση mg/ml της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

### 3.2.7. Προσδιορισμός της δραστηριότητας SOD

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της SOD στα δείγματα βασίστηκε στη μέθοδο του νιτροτετραζολιακού άλατος (NBT) σύμφωνα με τους Oberly & Spitz (1984). Πιο αναλυτικά, 800  $\mu\text{l}$  SOD buffer (1 mM DETAPAC σε 0,05 M potassium phosphate buffer (pH 7,8); 1 U καταλάσης;  $5,6 \times 10^{-5}$  M NBT;  $10^{-4}$  M ξανθίνης) αναμιγνύονται με 200  $\mu\text{l}$  0.05M potassium phosphate buffer. Στη συνέχεια μεταφέρονται σε κυψελίδα και γίνεται μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου. Έπειτα στην κυψελίδα προστίθενται ~60 mU οξειδάσης της ξανθίνης και μετράται η μεταβολή στην απορρόφηση για 3,5 min στα 560 nm. Ο ρυθμός αύξησης της απορρόφησης καταγράφεται και χρησιμοποιείται ως ο ρυθμός του μάρτυρα (control rate). Στη συνέχεια 200  $\mu\text{l}$  του ολικού κυτταρολύματος προστίθενται σε 800  $\mu\text{l}$  SOD



buffer και γίνεται μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου. Στη συνέχεια προστίθενται ~60 mU οξειδάσης της ξανθίνης και μετράται η μεταβολή στην απορρόφηση για 3,5 min στα 560 nm. Κάθε δείγμα εξετάζεται εις τριπλούν. Η μέτρηση απαιτεί >10μg απόλυτης ποσότητας πρωτεΐνης στο προς εξέταση δείγμα.

Το ποσοστό αναστολής υπολογίζεται ως εξής:

$$\% \text{ αναστολή} = \frac{(\text{control rate} - \text{sample rate}) / \text{control rate} \times 100}{\text{C}\delta}$$

Control rate: Ο ρυθμός μεταβολής της απορρόφησης του μάρτυρα ανά λεπτό.

Sample rate: Ο ρυθμός μεταβολής της απορρόφησης του δείγματος ανά λεπτό.

Cδ: Η συγκέντρωση mg/ml της πρωτεΐνης που προσδιορίστηκε μέσω του αντιδραστηρίου Bradford.

Η δραστηριότητα SOD εξετάστηκε σε τουλάχιστον 3 διαφορετικά προϊόντα λύσεως (κάθε προϊόν λύσης μετρήθηκε εις τριπλούν).

### 3.2.8. Στατιστική ανάλυση

Όλα τα αποτελέσματα εκφράζονται ως οι μέσες  $\pm$  SD. Για στατιστική ανάλυση, εφαρμόστηκε μονόδρομη ανάλυση ANOVA κι ακολουθήθηκε το Tukey τεστ για πολλαπλές συγκρίσεις κατά ζεύγη. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές σε  $P < 0,05$ . Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού SPSS (έκδοση 14.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### 3.3. Αποτελέσματα

#### 3.3.1. Ανάλυση Western blot για τον έλεγχο των επιπέδων των ενζύμων SOD, HO-1, CAT και GCS

Προκειμένου να εξεταστούν οι επιδράσεις της χορήγησης του εκχυλίσματος στεμφύλων στα επίπεδα έκφρασης αντιοξειδωτικών ενζύμων (δηλαδή, SOD, HO-1, CAT και GCS), τα μυϊκά κύτταρα C2C12 επώαστηκαν με το εκχύλισμα σε συγκεντρώσεις των 2,5 και 10  $\mu\text{g/ml}$ . Τα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 επώαστηκαν με το εκχύλισμα σε συγκεντρώσεις 0,068 και 0,250  $\mu\text{g/ml}$ .

Η χορήγηση του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση των 2,5  $\mu\text{g/ml}$  αύξησε σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης της GCS κατά 24,2 και 16,3% στις 18 και 24 ώρες, αντίστοιχα σε σύγκριση με την κατάσταση έλεγχου στο κυτοσολικό κυτταρόλυμα των κυττάρων C2C12 (Εικόνα 34A). Ωστόσο, η χορήγηση του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση των 10  $\mu\text{g/ml}$  αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της GCS στα κύτταρα C2C12 κατά 18,0, 20,3 και 26,1% στις 12, 18 και 24 ώρες επώασης, αντίστοιχα σε σύγκριση με την κατάσταση έλεγχου (Εικόνα 34A). Στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, η χορήγηση του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση των 0,068  $\mu\text{g/ml}$  αύξησε σημαντικά τα επίπεδα της GCS κατά 14% στις 24 ώρες επώασης, ενώ η χορήγηση του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση των 0,250  $\mu\text{g/ml}$  οδήγησε σε σημαντική αύξηση κατά 16,2% στις 18 ώρες και 21,3% στις 24 ώρες επώασης σε σύγκριση με την κατάσταση έλεγχου (Εικόνα 35A).

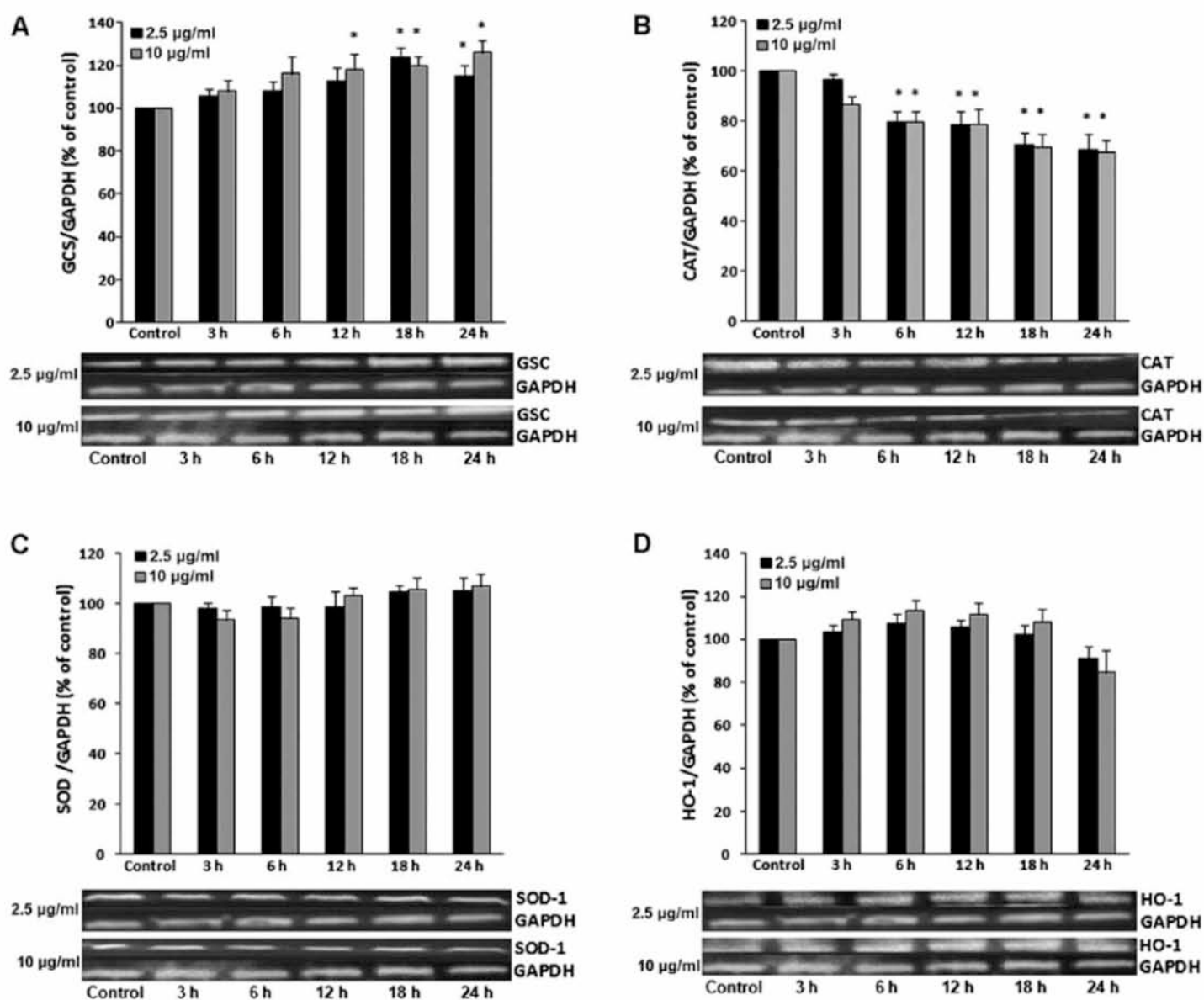
Επιπλέον, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η καλλιέργεια των κυττάρων C2C12 με το εκχύλισμα στη συγκέντρωση των 2,5  $\mu\text{g/ml}$  μείωσε σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης της CAT κατά 20,4, 21,3, 29,2 και 31,5% στις 6, 12, 18 και 24 ώρες



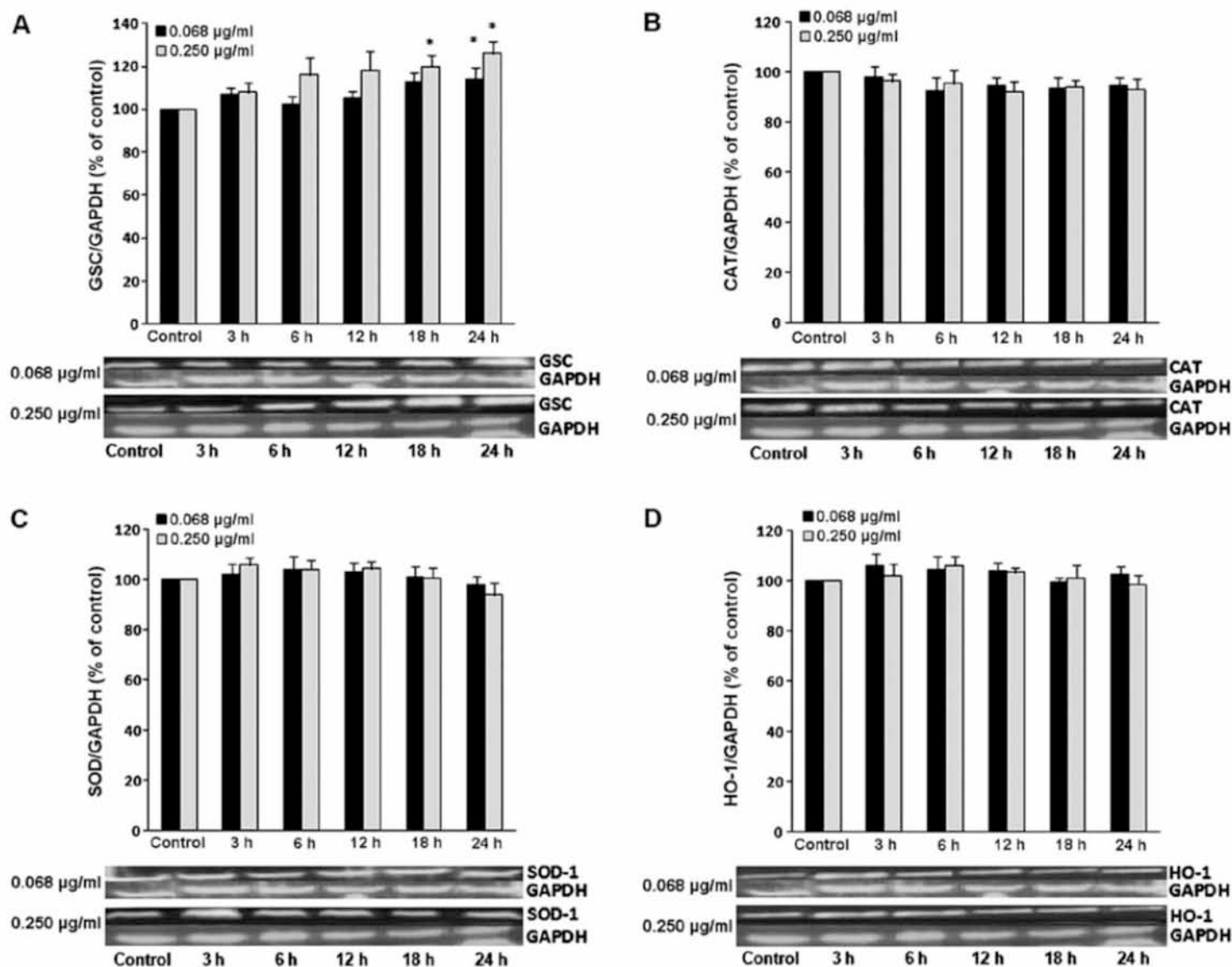
καλλιέργειας, αντίστοιχα, ενώ η χορήγηση του εκχυλίσματος στη συγκέντρωση των 10 µg/ml ελάττωσε τα επίπεδα της CAT κατά 20,7, 22,5, 30,3 και 32,3% στις 6, 12, 18 και 24 ώρες καλλιέργειας, αντίστοιχα, σε σύγκριση με την κατάσταση ελέγχου στο κυττοσολικό κυτταρόλυμα των κυττάρων C2C12 (Εικόνα 34B). Ωστόσο, στα κύτταρα EA.hy926, η χορήγηση του εκχυλίσματος δεν επηρέασε σημαντικά την έκφραση της CAT σε οποιαδήποτε συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (Εικόνα 35 B).

Επιπλέον, τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι καμία από τις συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκαν δεν επηρέασαν σημαντικά την έκφραση της SOD σε οποιοδήποτε χρονικό σημείο στο κυττοσολικό κυτταρόλυμα των κυττάρων C2C12 σε σύγκριση με την κατάσταση ελέγχου (Εικόνα 34C). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 (Εικόνα 35C).

Όπως παρατηρήθηκε στην έκφραση της SOD, η χορήγηση του εκχυλίσματος δεν μετέβαλλε σημαντικά τα επίπεδα της έκφρασης της HO-1 σε οποιαδήποτε εξεταζόμενη συγκέντρωση και σε οποιοδήποτε χρονικό σημείο σε σύγκριση με την κατάσταση ελέγχου των συνολικών κυττοσολικών κυτταρολυμάτων αμφοτέρων των C2C12 (Εικόνα 34D) και EA.hy926 κυττάρων (Εικόνα 35D).



Εικόνα 34. Αντιπροσωπευτικά στυπώματα Western που δείχνουν τα αποτελέσματα της επίδρασης του εκχυλίσματος στεμφύλων (GPE) στην έκφραση της (A) συνθετάσης της γ-γλουταμυλκυστεΐνης (GCS), (B) καταλάσης (CAT), (C) υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) και (D) οξυγονάσης της αίμης 1 (HO-1) σε μυϊκά κύτταρα C2C12. Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού για κανονικοποίηση όλων των ενζύμων παρουσιάζονται επίσης. Τα κύτταρα επώαστηκαν με GPE στις συγκεντρώσεις των 2,5 και 10 µg/ml για 3, 6, 12, 18 και 24 ώρες. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης για κανονικοποίηση. \* P < 0,05, στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τον μάρτυρα (μη επεξεργασμένα κύτταρα). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος ± SEM.



Εικόνα 35. Αντιπροσωπευτικά στυπώματα Western που δείχνουν τα αποτελέσματα της επίδρασης του εκχυλίσματος στεμφύλων (GPE) στην έκφραση της (Α) συνθετάσης της γ-γλουταμυλκυστεΐνης (GCS), (Β) καταλάσης (CAT), (C) υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) και (D) οξυγονάσης της αίμης Ι (HO-1) σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα αποτελέσματα του ποσοτικού προσδιορισμού για κανονικοποίηση όλων των ενζύμων παρουσιάζονται επίσης. Τα κύτταρα επωάστηκαν με GPE στις συγκεντρώσεις των 2,5 και 10 µg/ml για 3, 6, 12, 18 και 24 ώρες. Η έκφραση του GAPDH χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος φόρτωσης για κανονικοποίηση. \*  $P < 0,05$ , στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τον μάρτυρα (μη επεξεργασμένα κύτταρα). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσος όρος  $\pm$  SEM.

### 3.3.2. Αξιολόγηση της δραστηριότητας της GST

Στα C2C12 μυϊκά κύτταρα, η χορήγηση του εκχυλίσματος στεμφύλων σε συγκέντρωση 2,5 μg/ml αύξησε σημαντικά τη δραστηριότητα της GST στις 18 και 24 ώρες κατά 27,7 και 36,0%, αντίστοιχα, ενώ η χορήγηση του εκχυλίσματος σε συγκέντρωση 10 μg/ml αύξησε σημαντικά τη δραστηριότητα της GST κατά 37,7 και 59,0% στις 18 και 24 ώρες επώασης, αντίστοιχα σε σύγκριση με την κατάσταση ελέγχου (εικόνα 36A).

Στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, η χορήγηση του εκχυλίσματος στεμφύλων σε συγκέντρωση 0,068 μg/ml αύξησε σημαντικά τη δραστηριότητα της GST στις 24 ώρες κατά 16,3%, ενώ η χορήγηση του εκχυλίσματος σε συγκέντρωση των 0,250 μg/ml αύξησε τη δραστηριότητα της GST κατά 23,3 και 28,1% στις 18 και 24 ώρες, αντίστοιχα σε σχέση με την κατάσταση ελέγχου (εικόνα 37A).

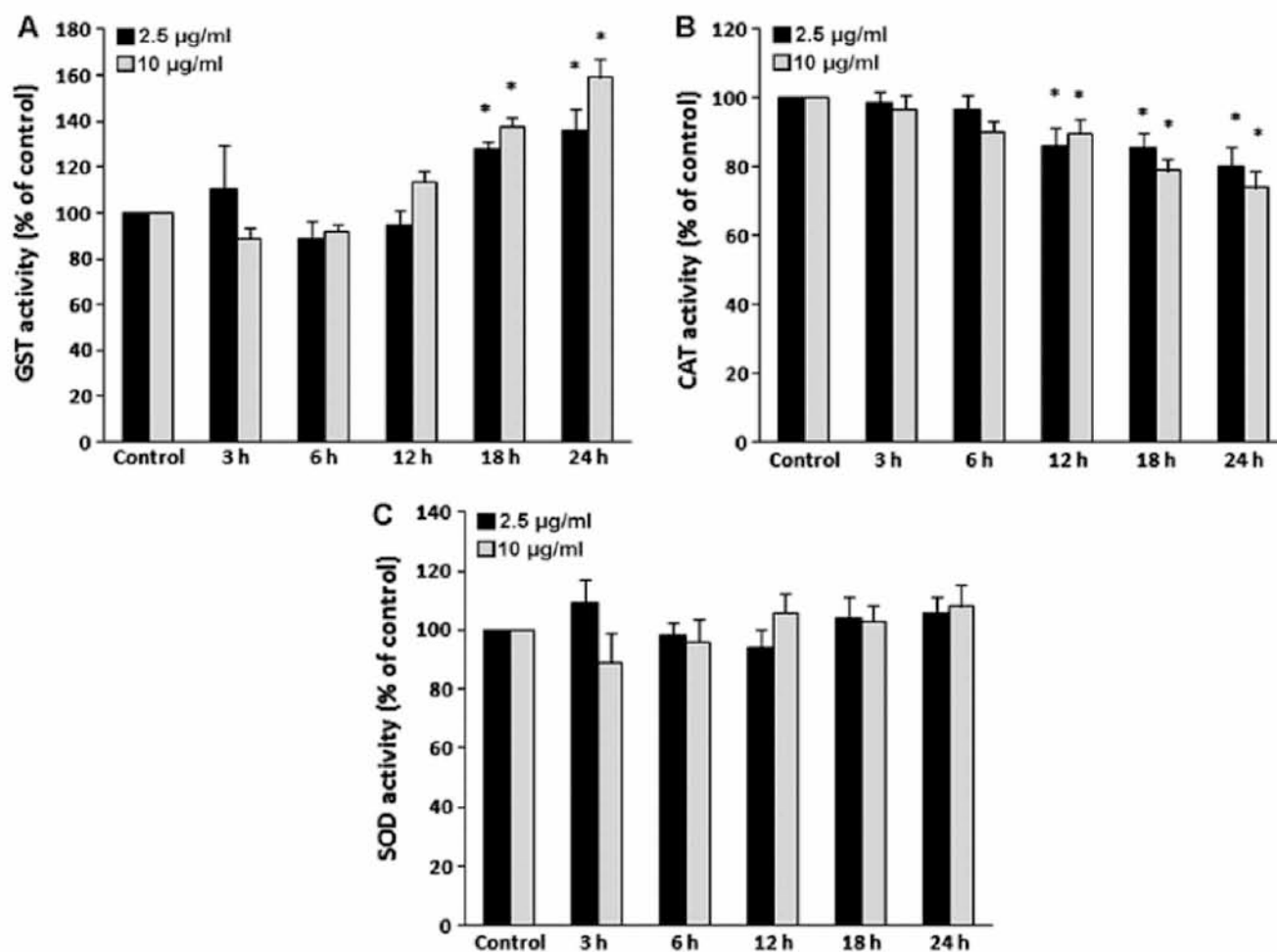
### 3.3.3. Αξιολόγηση της δραστηριότητας της CAT

Στα C2C12 μυϊκά κύτταρα, η χορήγηση του εκχυλίσματος στεμφύλων σε συγκέντρωση 2,5 μg/ml ελάττωσε σημαντικά την δραστηριότητα της CAT κατά 12,7, 14,5 και 19,5% στις 12, 18 και 24 ώρες, αντίστοιχα σε σύγκριση με τον μάρτυρα (εικόνα 36B), ενώ η χορήγηση του εκχυλίσματος στεμφύλων σε συγκέντρωση 10 μg/ml ελάττωσε τη δραστηριότητα της CAT κατά 8,3, 21,0 και 26,1% στις 12, 18 και 24 ώρες, αντίστοιχα σε σύγκριση με το μάρτυρα (εικόνα 36B).

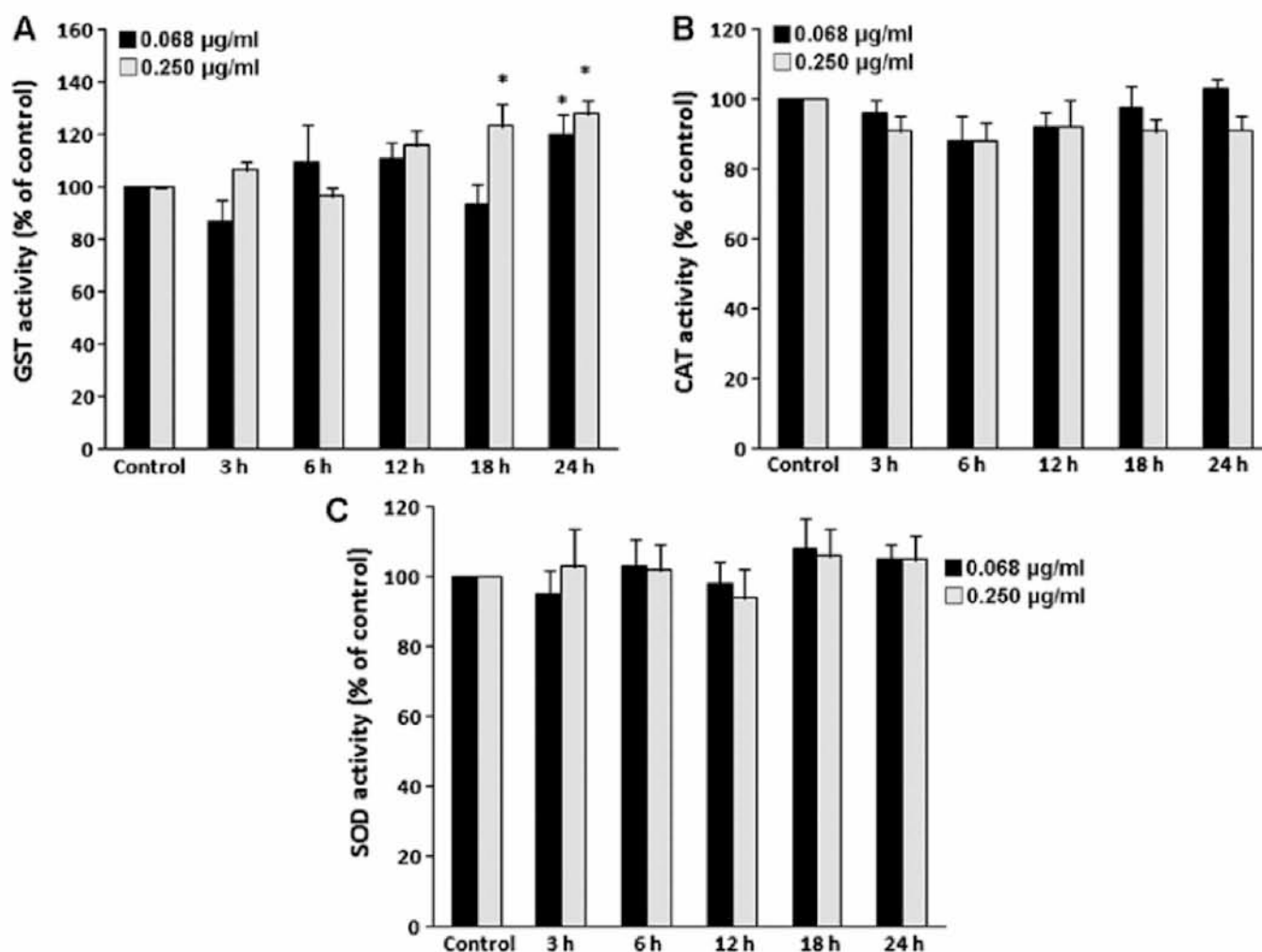
Στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, η χορήγηση του εκχυλίσματος στεμφύλων σε συγκεντρώσεις των 0,068 και 0,250 μg/ml δεν επηρέασε σημαντικά τη δραστηριότητα της CAT σε οποιοδήποτε χρονική στιγμή σε σύγκριση με τον μάρτυρα (εικόνα 37B).

#### **3.3.4. Αξιολόγηση της δραστηριότητας της SOD**

Στα μυϊκά κύτταρα C2C12, η χορήγηση του εκχυλίσματος στεμφύλων δεν επηρέασε σημαντικά την δραστηριότητα της SOD σε οποιαδήποτε συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε σε οποιαδήποτε χρονική στιγμή σε σύγκριση με τον μάρτυρα (εικόνα 36C). Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στα ενδοθηλιακά κύτταρα (εικόνα 37C).



Εικόνα 36. Επίδραση του εκχυλίσματος στεμφύλων (GPE) στην ενζυμική δραστηριότητα της (Α) S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), (Β) καταλάσης (CAT) και (Γ) υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) σε μυϊκά κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα επωάστηκαν με GPE σε συγκεντρώσεις 2,5 και 10 µg/ml για 3, 6, 12, 18 και 24 ώρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως εκατοστιαίο ποσοστό των τιμών του μάρτυρα. \*  $P < 0,05$ , στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τον μάρτυρα (μη επεξεργασμένα κύτταρα). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσο  $\pm$  SEM.



Εικόνα 37. Επίδραση του εκχυλίσματος στεμφύλων (GPE) στην ενζυμική δραστηριότητα της (Α) S-τρανσφεράσης της γλουταθειόνης (GST), (Β) καταλάσης (CAT) και (C) υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) σε ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926. Τα κύτταρα επώαστηκαν με GPE σε συγκεντρώσεις 2,5 και 10 μg/ml για 3, 6, 12, 18 και 24 ώρες. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως εκατοστιαίο ποσοστό των τιμών του μάρτυρα. \*  $P < 0,05$ , στατιστικά σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τον μάρτυρα (μη επεξεργασμένα κύτταρα). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσο  $\pm$  SEM.

### 3.4. Συζήτηση

Στην μελέτη που προηγήθηκε, δείχθηκε ότι η χορήγηση του εκχυλίσματος στεμφύλων μείωσε το οξειδωτικό στρες σε ενδοθηλιακά και μυϊκά κύτταρα. Στην παρούσα μελέτη, ο σκοπός ήταν η διερεύνηση των μηχανισμών μέσω των οποίων ασκούνται αυτές οι αντιοξειδωτικές επιδράσεις του εκχυλίσματος. Τα αποτελέσματα της χορήγησης του εκχυλίσματος στεμφύλων σε αντιοξειδωτικά ένζυμα αξιολογήθηκαν στα ενδοθηλιακά EA.hy926 και στα μυϊκά C2C12 κύτταρα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι συγκεντρώσεις του εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκαν ήταν μη κυτταροτοξικές και πολύ χαμηλές, σε αντίθεση με αρκετές μελέτες για αντιοξειδωτικές ενώσεις, όπου οι υψηλές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, είναι δύσκολο να επιτευχθούν στον ανθρώπινο οργανισμό ή εμφανίζουν τοξικότητα.

Η γλουταθειόνη, είναι ένα τριπεπτίδιο που αποτελείται από γλυκίνη, κυστεΐνη και γλουταμικό οξύ, και αποτελεί ένα από τα πιο κρίσιμα αντιοξειδωτικά μόρια στα κύτταρα και εμπλέκεται στην αποτοξίνωση ενός αριθμού ξеноβιοτικών και των ROS είτε μέσω του σχηματισμού S-συζευξέων ή χρησιμεύοντας ως ένας δότης ηλεκτρονίων από την ομάδα σουλφυδρυλίου της (-SH) (Aquilano et al., 2014). Σύζευξη με GSH μπορεί να συμβεί τόσο ενζυμικά όσο και μη-ενζυμικά. Σε ανθρώπινους οργανισμούς, υπάρχουν 3 κύρια ένζυμα που εμπλέκονται στις δράσεις της GSH: η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx), η οποία διασπά το  $H_2O_2$  που παράγεται κατά τη διάρκεια του κυτταρικού μεταβολισμού (Aquilano et al., 2014), η τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST), η οποία συζευγνύει τη γλουταθειόνη με διάφορες ξеноβιοτικές ουσίες με σκοπό την αποτοξίνωσή τους (Aquilano et al., 2014), και τη ρεδοκτάση της γλουταθειόνης (GRX), η οποία ελέγχει το οξειδοαναγωγικό κυτταρικό περιβάλλον (Lu and Holmgren, 2014). Στην προηγούμενη μελέτη, δείχθηκε ότι η χορήγηση του εκχυλίσματος στεμφύλων αύξησε



τα επίπεδα της GSH σε κύτταρα EA.hy926 και C2C12 είτε υπό φυσιολογικές συνθήκες ή υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες. Αυτή η αύξηση στα επίπεδα της GSH εξηγείται από την επαγόμενη από το εκχύλισμα αύξηση στην έκφραση του ενζύμου GCS στα κύτταρα EA.hy926 και C2C12. Η GCS είναι το πρώτο ένζυμο στη βιοσυνθετική οδό της GSH και, κατά συνέπεια, είναι κρίσιμο για την επιβίωση των κυττάρων (Dalton et al., 2004). Έχει επίσης αναφερθεί ότι τα φλαβονοειδή αυξάνουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της γλουταθειόνης με *trans*-ενεργοποίηση του υποκινητή της καταλυτικής υπομονάδας της GCS (Myhrstad et al., 2002). Η σημασία της GSH για την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος στεμφύλων υποστηρίζεται επίσης από την επαγόμενη από το εκχύλισμα αύξηση στη δραστηριότητα της GST. Η GST επάγεται υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες και εμπλέκεται στην αποτοξίνωση των οργανικών εποξειδίων, υδροϋπεροξειδίων και ακόρεστων αλδευδών που σχηματίζονται κυρίως μετά την υπεροξείδωση των λιπιδίων (Fernández-Iglesias et al., 2014). Η GST αποτοξινώνει τα προϊόντα αυτά μέσω της σύζευξής τους με την GSH. Σημειώνεται, ότι η προηγούμενη μελέτη (Κεφάλαιο 2) έδειξε ότι το εκχύλισμα στεμφύλων μείωσε τα προϊόντα υπεροξείδωσης των λιπιδίων στα κύτταρα C2C12 και EAhy.926. Κατά συνέπεια, αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να αποδοθεί στην επαγόμενη από το εκχύλισμα αύξηση στη δραστηριότητα της GST. Η αύξηση της δραστηριότητας της GST μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των επιπέδων της GSH (Fernández-Iglesias et al., 2014). Ωστόσο, φαίνεται ότι η επαγόμενη από εκχύλισμα αύξηση στα επίπεδα της GCS οδήγησε σε *de novo* σύνθεση της GSH που παρεμποδίζεται η μείωση των επιπέδων της GSH που προκαλούνται από τη δραστηριότητα της GST.

Με βάση τα προαναφερθέντα ευρήματα, μπορεί να συναχθεί ότι τα συστήματα της GSH παίζουν κρίσιμο ρόλο στις αντιοξειδωτικές επιδράσεις που ασκούνται από εκχύλισμα στεμφύλων στα ενδοθηλιακά και μυϊκά κύτταρα. Επιπλέον,

διάφορες μελέτες που διεξήχθησαν *in vivo*, χρησιμοποιώντας καλλιέργειες κυττάρων έχουν δείξει ότι τα εκχυλίσματα γιγάρτων σταφυλιού ασκούν αντιοξειδωτικές επιδράσεις μέσω της επαγωγής των συστημάτων της GSH σε μεγάλη ποικιλία ιστών και οργάνων, όπως το ήπαρ, τα νεφρά, την καρδιά, το δέρμα, το πάγκρεας, το αίμα και ο εγκέφαλος (Fernández-Iglesias et al., 2014; Filip et al., 2011; Janiques et al., 2014; Zhen et al., 2014; Yousef et al., 2009; Zhang and Hu, 2012; Saada et al., 2009). Παρά το γεγονός ότι ένας μεγάλος αριθμός μελετών έχουν δείξει ότι εκχυλίσματα από γίγαρτα σταφυλιού ενισχύουν τα επίπεδα της GSH, υπάρχουν μόνο λίγες διαθέσιμες μελέτες που έχουν χρησιμοποιήσει εκχυλίσματα στεμφύλων (Fernández-Iglesias et al., 2014; Zhen et al., 2014; Lakshmi et al., 2013; Chen et al., 2015; Song et al., 2013; Song et al., 2015; Choi et al., 2010; Chidambara et al., 2002). Τα αποτελέσματά μας παρέχουν περαιτέρω αποδείξεις ότι τα εκχυλίσματα σταφυλιού, σε γενικές γραμμές, δρουν ως αντιοξειδωτικά, μέσω της διαφοροποίησης των συστημάτων της GSH.

Το εκχύλισμα στεμφύλων δεν φαίνεται να ασκεί την αντιοξειδωτική δράση του μέσω της διαφοροποίησης των επιπέδων, των άλλων αντιοξειδωτικών ενζύμων που μελετήθηκαν (π.χ., CAT, SOD και HO-1 ένζυμα). Η SOD μετατρέπει τις ρίζες του  $O_2^{\bullet-}$  που παράγεται κατά τη διάρκεια του οξειδωτικού στρες σε  $H_2O_2$  (Fridovich et al., 2011). Το  $H_2O_2$  μπορεί να μετατραπεί σε επιβλαβή ROS, αλλά μπορεί να μετατραπεί σε νερό και οξυγόνο με τη δράση της CAT (Kodydková et al., 2014). Σε αυτή τη μελέτη, η χορήγηση του εκχυλίσματος στεμφύλων μείωσε τόσο την έκφραση όσο και τη δραστηριότητα του ενζύμου CAT σε μυϊκά κύτταρα, ενώ στα ενδοθηλιακά κύτταρα, δεν είχε κανένα αποτέλεσμα. Το εκχύλισμα στεμφύλων δεν επηρέασε την έκφραση ή τη δραστηριότητα της SOD στα κύτταρα EA.hy926 και C2C12. Το γεγονός ότι το εκχύλισμα δεν είχε καμία επίδραση (ή ακόμη και μείωση), στην

έκφραση και στη δραστικότητα της CAT και της SOD μπορεί να εξηγηθεί από την ικανότητά του να ενισχύσει άλλους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, όπως της GSH, μέσω της αύξησης των επιπέδων της GCS και της δραστικότητας της GST. Παρόμοια με τα αποτελέσματά μας, άλλες μελέτες έχουν αναφέρει ότι τα εκχυλίσματα σταφυλιού δεν επηρεάζουν τα ένζυμα CAT και SOD (Fernández-Iglesias et al., 2014; Yang et al., 2014). Ωστόσο, η χορήγηση εκχυλίσματος στεμφύλων σε αρουραίους έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την δραστικότητα της CAT και της SOD στο ήπαρ και τους νεφρούς (Lakshmi et al., 2013). Επιπλέον, τα εκχυλίσματα γιγάρτων σταφυλιού έχει αποδειχθεί ότι αυξάνουν τη δραστικότητα της CAT και της SOD σε διάφορους ιστούς (Filip et al., 2011; Saada et al., 2009). Αυτές οι διαφορές μεταξύ των αποτελεσμάτων των διαφόρων μελετών μπορούν να αποδοθούν στους διαφορετικούς ιστούς που μελετούνται, καθώς και στη διαφορετική χημική σύνθεση των εξετασθέντων εκχυλισμάτων. Επιπλέον ο Yang et al. (2014) ανέφερε ότι οι επιπτώσεις του εκχυλίσματος γιγάρτων σταφυλιού στη δραστικότητα της CAT και της SOD σε ευκαρυωτικά κύτταρα εξαρτάται από την παρουσία ή την απουσία του ερεθίσματος οξειδωτικού στρες και προκαλείται μέσω του μονοπατιού σηματοδότησης της εξωκυτταρικού σήματος ρυθμιζόμενης κινάσης 1/2 (ERK 1/2).

Η HO-1 θεωρείται επίσης ένα σημαντικό αντιοξειδωτικό ένζυμο (Son et al., 2013). Η HO-1 είναι μια πανταχού παρούσα κυτταρική πρωτεΐνη επαγωγίμη από συνθήκες στρες και είναι το περιοριστικό ένζυμο στον καταβολισμό της αίμης προς βιλιβερδίνη, ελεύθερο σίδηρο και μονοξείδιο του άνθρακα. Η βιλιβερδίνη μετατρέπεται ταχέως στο ισχυρό αντιοξειδωτικό μόριο, χολερυθρίνη, η οποία στη συνέχεια μετατρέπεται πάλι σε βιλιβερδίνη μέσω της αντίδρασής της με ROS, που οδηγεί σε εξουδετέρωση τους (Son et al., 2013). Σε αυτή τη μελέτη, η χορήγηση του εκχυλίσματος στεμφύλων δεν επηρέασε την έκφραση της HO-1 στα ενδοθηλιακά και

μυϊκά κύτταρα. Έτσι, οι αντιοξειδωτικές επιδράσεις του GPE δεν φαίνεται να προκαλούνται μέσω της δραστηριότητας της HO-1. Παρόμοια με τα αποτελέσματά μας, σε μια προηγούμενη μελέτη, ένα εκχύλισμα γιγάρτων σταφυλιών πλούσιο σε προκυανιδίνες δεν ήταν σε θέση να αυξήσει την έκφραση της HO-1 σε κύτταρα του ήπατος (HepG2), αν και ενεργοποίησε το μονοπάτι σηματοδότησης του πυρηνικού μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 / αντιοξειδωτικό στοιχείου απόκρισης (ARE) (Bak et al., 2012). Το μονοπάτι Nrf2 / ARE είναι η κύρια οδός σηματοδότησης που ρυθμίζει την έκφραση της HO-1 (Jeong et al., 2006). Σε μια άλλη μελέτη, η χορήγηση εκχυλίσματος σταφυλιού σε ποντικούς αύξησε τα επίπεδα έκφρασης της HO-1 μέσω ενεργοποίησης του μεταγραφικού παράγοντα Nrf2 στους όρχεις (Li et al., 2015). Ωστόσο, αυτό το εκχύλισμα από γίγαρτα σταφυλιού ήταν ιδιαίτερα πλούσιο σε προανθοκυανιδίνες. Επιπλέον, η ρεσβερατρόλη, μία από τις κύριες πολυφαινόλες που υπάρχουν στα εκχυλίσματα στεμφύλων, έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει την δραστηριότητα της HO-1 σε νευρικά κύτταρα ποντικού (Sakata et al., 2010).

Εν κατακλείδι, τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι η χορήγηση του εκχυλίσματος στεμφύλων ασκεί αντιοξειδωτική δράση στα ενδοθηλιακά κύτταρα και κυρίως στα μυϊκά κύτταρα μέσω της επαγωγής των ενζύμων GCS και GST. Τα αποτελέσματα αυτά, μαζί με εκείνα της προηγούμενης μελέτης, δείχνουν ότι το εκχύλισμα αυξάνει τα επίπεδα της γλουταθειόνης στα κύτταρα EA.hy926 και C2C12, γεγονός που υποδηλώνει τον κρίσιμο ρόλο των συστημάτων της γλουταθειόνης στην αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος στεμφύλων. Έτσι, το εκχύλισμα στεμφύλων μπορεί να αποδειχθεί αποτελεσματικό για χρήση ως συμπλήρωμα διατροφής για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από παθολογικές συνθήκες στο καρδιαγγειακό και σκελετικό μυϊκό σύστημα, ιδίως σε εκείνες που συνδέονται με χαμηλά επίπεδα GSH. Αν και υπάρχουν πολλές μελέτες που δείχνουν ότι τα

εκχυλίσματα από γίγαρτα σταφυλίου προστατεύουν το καρδιαγγειακό και το μυϊκό σύστημα από τη βλάβη που προκαλείται από ROS, υπάρχουν μόνο λίγες μελέτες χρησιμοποιώντας εκχυλίσματα στεμφύλων (Saada et al., 2009; Luzak et al., 2014; Luan et al., 2014; Milenkovic et al., 2014; Badavi et al., 2013; Pajuelo et al., 2011; Ding et al., 2013; Pajuelo et al., 2011; Diaz et al., 1997; Rodriguez-Rodriguez et al., 2012). Φυσικά, οι in vivo μελέτες απαιτούνται, επίσης, για να επιβεβαιωθούν τα παραπάνω ευρήματα.

## ***ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4***

***Η πολυφαινολική σύσταση εκχυλισμάτων βοστρύχων  
επηρεάζει την αντιοξειδωτική τους δράση σε μυϊκά και  
ενδοθηλιακά κύτταρα***

#### 4.1. Γενικά

Οι δραστικές μορφές οξυγόνου (ROS) είναι χημικά αντιδραστικά μόρια που περιέχουν οξυγόνο. Στις ROS περιλαμβάνονται οι ελεύθερες ρίζες, όπως η ρίζα του υπεροξειδίου ( $O_2^{\bullet-}$ ), η ρίζα υδροξυλίου ( $OH^{\bullet}$ ) και η ρίζα του υπεροξυλίου ( $ROO^{\bullet}$ ), καθώς και μη-ρίζες, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $H_2O_2$ ), τα οποία είναι προϊόντα του κυτταρικού μεταβολισμού, της φλεγμονής, της φαγοκυττάρωσης, και παίζουν ρόλο στην ενδοκυτταρική σηματοδότηση, στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την απόπτωση και άλλες φυσιολογικές διεργασίες (Halliwell, 2001; Reid, 2008). Το οξειδωτικό στρες ορίζεται ως μια ανισορροπία μεταξύ της παραγωγής ελευθέρων ριζών και της ικανότητας του οργανισμού να εξουδετερώσει ή να αποτοξινώσει τις βλαβερές επιδράσεις τους μέσω εξουδετέρωσης με αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς (Halliwell, 2001). Καθώς οι ελεύθερες ρίζες είναι πολύ δραστικά είδη, η υπερπαραγωγή τους μπορεί να προκαλέσει βλάβη σε όλα τα βιολογικά μακρομόρια, όπως το DNA, πρωτεΐνες και λιπίδια, οδηγώντας έτσι σε κυτταρική βλάβη και στη συνέχεια, στην εκδήλωση παθολογικών καταστάσεων (Halliwell, 2001).

Το οξειδωτικό στρες συμβαίνει συχνά στον μυϊκό ιστό. Ειδικότερα, κατά τη διάρκεια έντονης άσκησης, υπάρχει ένα υψηλό ποσοστό κατανάλωσης  $O_2$  στο σκελετικό μυ που μπορεί να προκαλέσει ατελή αναγωγή του  $O_2$  και διαρροή ηλεκτρονίων από την αναπνευστική αλυσίδα, που οδηγεί στην παραγωγή ROS και οξειδωτικού στρες, με αποτέλεσμα την εμφάνιση μυϊκής κόπωσης, την καταστροφή των κυττάρων και την απόπτωση (Reid, 2008; Nunes-Silva et al., 2014; Di Meo and Venditti, 2001).

Περαιτέρω, το οξειδωτικό στρες που προκαλείται κατά τη βλάβη του αγγειακού ενδοθηλίου είναι ένα από τους σημαντικότερους παράγοντες των

καρδιαγγειακών παθήσεων (Deanfield et al., 2007; Victor et al., 2009; Higashi et al., 2009). Για παράδειγμα, το οξειδωτικό στρες σε ενδοθηλιακά κύτταρα επάγεται από οξείες και χρόνιες φάσεις της προσκόλλησης λευκοκυττάρων στο ενδοθήλιο (Kokura et al., 1999; Zou et al., 2006). Επιπλέον, η αλληλεπίδραση μεταξύ των ROS και του μονοξειδίου του αζώτου πυροδοτεί έναν φαύλο κύκλο που οδηγεί σε περαιτέρω ενεργοποίηση του ενδοθηλίου και εμφάνιση φλεγμονής (Deanfield et al., 2007). Επιπλέον, οι ROS, όπως το  $H_2O_2$  μπορούν να διαχέονται σε όλα τα ενδοθηλιακά κύτταρα και να αντιδρούν με ομάδες κυστεΐνης σε πρωτεΐνες τροποποιώντας τη λειτουργία τους (Rhee, 2006). Έτσι, υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες, τα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί να χάσουν την ακεραιότητά τους, την φυσιολογική γήρανση και αποσπώνται στην κυκλοφορία (Woywodt et al., 2002).

Ωστόσο, κάθε ζωντανός οργανισμός έχει αντιοξειδωτικές μηχανισμούς για την αντιμετώπιση του οξειδωτικού στρες (Halliwell, 2001). Εκτός από τους ενδογενείς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, η συμπλήρωση αντιοξειδωτικών μορίων μέσω της διατροφής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να μειθούν οι επιβλαβείς επιδράσεις του οξειδωτικού στρες στην υγεία του ανθρώπου, όπως προτείνεται από προηγούμενες μελέτες (Matthaiou et al., 2014; Kerasioti et al., 2012). Μερικές από τις πιο γνωστές πηγές τροφίμων πλούσιων σε αντιοξειδωτικά είναι τα σταφύλια (Bagchi et al., 2014). Η ερευνητική μας ομάδα, τα τελευταία χρόνια έχει πραγματοποιήσει διάφορες μελέτες σχετικά με τις αντιοξειδωτικές ιδιότητες των σταφυλιών, τα οποία οφείλονται κυρίως στο πολυφαινολικό τους περιεχόμενο (Apostolou et al., 2013; Spanou et al., 2011; Stagos et al., 2005; 2006; 2007). Έχουν επίσης πραγματοποιηθεί, μια σειρά μελετών σχετικά με την αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων από βοστρύχους, ένα υποπροϊόν της διαδικασίας της οινοποίησης που έχει διερευνηθεί ελάχιστα (Apostolou et al., 2013; Anastasiadi et al., 2009;



Sahpazidou et al., 2014; Stagos et al., 2014; Kantsadi et al., 2014). Για παράδειγμα, σε μία από τις προηγούμενες μελέτες μας, αποδείξαμε ότι τα εκχυλίσματα βοστρύχου σταφυλιού είναι πλούσια σε βιοδραστικές πολυφαινόλες (π.χ., φλαβονοειδή, στυλβένια και φαινολικά οξέα) (Anastasiadi et al., 2009), και παρουσιάζουν ισχυρή ικανότητα σάρωσης ελεύθερων ριζών in vitro (Apostolou et al., 2013).

Έτσι, ο στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να εξετασθεί πρώτα η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιού από τρεις ελληνικές ποικιλίες αμπέλου (*Vitis vinifera*) (δηλαδή, Μανδηλαριά, Μαυροτράγανο και Μοσχόμαυρο) σε κυτταρικό επίπεδο, ιδιαίτερα στα ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926 και στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Επιπλέον, δεδομένου ότι η πολυφαινολική σύσταση των σταφυλιών έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει την αντιοξειδωτική δράση του κρασιού και των εκχυλισμάτων γιγάρτων σταφυλιών (Zhu et al., 2012; Meng et al., 2012), ερευνήθηκε επίσης αν η πολυφαινολική σύσταση των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιού επηρεάζει την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Τα εκχυλίσματα σταφυλιού μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντιοξειδωτικά συμπληρώματα διατροφής για τη μείωση των οξειδωτικών στρες που προκαλείται από επιβλαβείς επιδράσεις στην ανθρώπινη υγεία, και έτσι η κατανόηση των μηχανισμών μέσω των οποίων ασκούν την βιοδραστικότητά τους έχει ιδιαίτερη σημασία.

## **4.2. Υλικά και Μέθοδοι**

### **4.2.1. Παρασκευή των εκχυλισμάτων**

Τα εκχυλίσματα βοστρύχων σταφυλιού που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από τις ελληνικές ποικιλίες σταφυλιού, Μανδηλαριά, Μαυροτράγανο και Μοσχόμαυρο. Η απομόνωση των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται σε προηγούμενη μελέτη (Apostolou et al., 2013). Εν συντομία, 50 g

αποξηραμένου δείγματος (κονιοποιημένοι μίσχοι σταφυλιού) προστέθηκαν μέσα σε ένα μίγμα 200 ml μεθανόλης (MeOH) /H<sub>2</sub>O/1.0 N HCl (90: 9.5: 0.5 v/v) και υφίσταται κατεργασία με υπερήχους σε ένα λουτρό υπερήχων για 10 min. Ο διαλύτης διαχωρίστηκε με διήθηση, και το απομένον στερεό επανα-εκχυλίστηκε τρεις επιπλέον φορές, χρησιμοποιώντας το ίδιο σύστημα διαλύτη και την ίδια διαδικασία. Τα συνδυασμένα εκχυλίσματα εξατμίστηκαν υπό κενό, με αποτέλεσμα την δημιουργία ενός εναιωρήματος, το οποίο διαλύθηκε σε 30 ml διαλύματος αποτελούμενο από MeOH / H<sub>2</sub>O (1:1) και φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά (7000 rpm). Το υγρό υπερκείμενο εκχυλίζεται με πετρελαϊκό αιθέρα (3 x 30 ml) για την απομάκρυνση των λιπιδίων και συμπυκνώθηκε υπό κενό. Το εναπομείναν υπόλειμμα χύθηκε εντός 30 ml άλμης και εκχυλίστηκε επανειλημμένα με οξικό αιθυλεστέρα (EtOAc, 4 x 30 ml). Έτσι, όλα τα σάκχαρα παρέμειναν στην υδατική στοιβάδα. Οι συνδυασμένες οργανικές στιβάδες στη συνέχεια ξηράνθηκαν πάνω από άνυδρο θειικό μαγνήσιο και εξατμίστηκαν υπό κενό. Το παραμένον στερεό ζυγίστηκε και διαλύθηκε σε MeOH σε συγκέντρωση 1 mg/ml, και διηθήθηκε με τη χρήση μεμβράνης (0.45 μm). Για να αποφευχθεί η υποβάθμιση των πολυφαινολών, όλες οι προαναφερθείσες δραστηριότητες διεξήχθησαν απουσία άμεσου ηλιακού φωτός και σε θερμοκρασίες κάτω από 35 °C.

#### **4.2.2. Μέθοδοι προσδιορισμού του συνολικού πολυφαινολικού περιεχόμενου και της in vitro αντιοξειδωτικής δράσης εκχυλισμάτων**

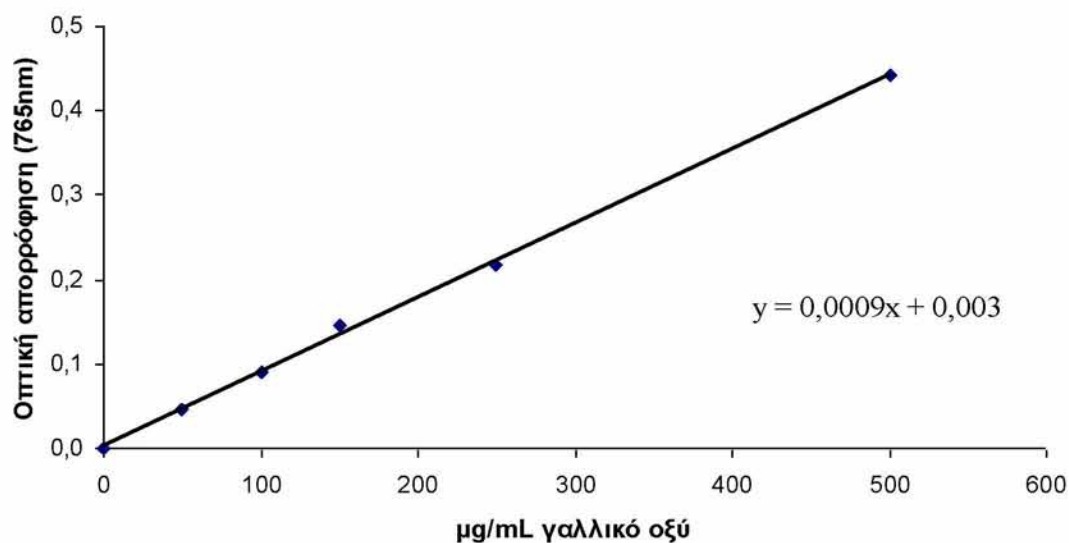
##### **4.2.2.α. Προσδιορισμός του συνολικού πολυφαινολικού περιεχόμενου μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu**

Η μέθοδος βασίζεται σε μια χρωματογραφική οξειδοαναγωγική αντίδραση με τη χρήση της οποίας προσδιορίζεται το συνολικό φαινολικό περιεχόμενο μέσω του αντιδραστηρίου Folin-Ciocalteu (FC) (Merck, Darmstadt, Germany) (Vermeris & Nicholson, 2006). Το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu είναι διάλυμα σύνθετων πολυμερών ιόντων που σχηματίζονται από φωσφομολυβδαινικά και φωσφοβολφραμικά ετεροπολυμερή οξέα. Οξειδώνει τα φαινολικά ιόντα με ταυτόχρονη αναγωγή των ετεροπολυμερών οξέων ( $P_2W_{18}O_{62}^{-7} \rightarrow H_4P_2W_{18}O_{62}^{-8}$ ,  $H_2P_2Mo_{18}O_{62}^{-6} \rightarrow H_6P_2Mo_{18}O_{62}^{-7}$ ). Το προϊόν είναι σύμπλεγμα μολυβδαινίου – βολφραμίου (Mo-W) χαρακτηριστικής μπλε χρώσης που απορροφά στο ορατό φάσμα σε μήκος κύματος 765 nm. Η αλκαλικότητα ρυθμίζεται με κορεσμένο διάλυμα  $Na_2CO_3$ , αποτελεί προϋπόθεση για την παρουσία των φαινολικών ιόντων και δεν διαταράσσει τη σταθερότητα του αντιδραστηρίου FC και του προϊόντος της αντίδρασης.

Σε σωληνάρια falcon των 15 ml προστίθενται απιονισμένο νερό όγκου 5 ml και 100  $\mu$ l του προς εξέταση δείγματος, φυτικού πολυφαινολικού εκχυλίσματος. Στο τυφλό προστίθενται 100  $\mu$ l απιονισμένου  $H_2O$ . Στην συνέχεια προστίθενται 500  $\mu$ l του αντιδραστηρίου FC. Τα δείγματα ανακινούνται και μετά την πάροδο 3 min σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται 1,4 ml διαλύματος  $Na_2CO_3$  25% w/v. Το μίγμα ανακινείται. Ακολουθεί συμπλήρωση του όγκου στα 10 ml με απιονισμένο νερό. Το

μίγμα ανακινείται ξανά και επωάζεται για 1 h στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 765 nm σε φασματοφωτόμετρο Hitachi U-1500 (San Jose, USA) ως προς το τυφλό δείγμα. Κάθε εξεταζόμενο εκχύλισμα δοκιμάστηκε εις τριπλούν. Εξετάστηκε ακόμη και η οπτική απορρόφηση των εκχυλισμάτων στα 765 nm χωρίς την παρουσία του αντιδραστηρίου FC η οποία αφαιρείται από την τελική απορρόφηση της αντίδρασης.

Ο προσδιορισμός της ολικής ποσότητας πολυφαινολικών ενώσεων των εκχυλισμάτων γίνεται μέσω πρότυπης καμπύλης του γαλλικού οξέος. Τα εκχυλίσματα μπορεί να χρειάζονται αραίωση ώστε η απορρόφηση να είναι στο εύρος των τιμών της πρότυπης καμπύλης. Η πρότυπη καμπύλη του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε με συγκεντρώσεις 0, 50, 100, 150, 250 και 500  $\mu\text{g/ml}$  γαλλικού οξέος. Με βάση τις τιμές της οπτικής απορρόφησης που αντιστοιχούσαν στις συγκεντρώσεις του γαλλικού οξέος κατασκευάστηκε καμπύλη και προσδιορίστηκε η εξίσωση  $y = 0,0009x + 0,003$  με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης κατά Spearman  $r = 0,998$  με  $p < 0,01$  (Εικόνα 22). Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (total polyphenol content, TPC) ανάγεται στο αρχικό εκχύλισμα και εκφράζεται ως mg GA/g (Gallic Acid, GA) εκχυλίσματος.



Εικόνα 38. Πρότυπη καμπύλη γαλλικού οξέος.

#### 4.2.2.β. Προσδιορισμός της πολυφαινολικής σύστασης των εκχυλισμάτων με HPLC

Η πολυφαινολική σύσταση των εκχυλισμάτων αξιολογήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) όπως περιγράφεται προηγουμένως (Apostolou et al., 2013). Συγκεκριμένα, HPLC διεξήχθη σε ένα σύστημα Hewlett Packard HP1100 εφοδιασμένη με τεταρτοταγή αντλία και απαερωτή. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν μια στήλη Kromasil C18 (250 mm × 4,6 χιλιοστά, μέγεθος σωματιδίων 5 μm) με μια προστήλη από το ίδιο υλικό (8 × 4 mm). Η έγχυση γινόταν μέσω μιας βαλβίδας έγχυσης Rheodyne (μοντέλο 7725I). Για τις χρωματογραφικές αναλύσεις HPLC βαθμίδωση νερού παρασκευάστηκε χρησιμοποιώντας ένα σύστημα Milli-Q, ενώ όλοι οι διαλύτες HPLC διηθήθηκαν πριν από τη χρήση μέσα από μεμβράνες οξικής κυτταρίνης με μέγεθος πόρου 0,45 μm. Τα χρωματογραφικά δεδομένα αποκτήθηκαν και επεξεργάστηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό

Chemstation. Πιο συγκεκριμένα, η ανάλυση διεξήχθη στους 30 °C (που διατηρείται με θερμοστάτη στήλης) χρησιμοποιώντας δείγματα των 20 μl, τα οποία εγχέονται απευθείας μέσω μιας βαλβίδας Rheodyne (μοντέλο 7725I). Η βαθμίδωση των εκλουσθέντων αποτελούνταν από τον διαλύτη A (που λαμβάνεται με την προσθήκη 3% οξικό οξύ σε υδατικό διάλυμα οξικού 2 mM νάτριο) και τον διαλύτη B (ακετονιτρίλιο, CH<sub>3</sub>CN). Ο χρόνος ανάλυσης ορίστηκε στα 70 min με ένα σταθερό ρυθμό ροής 1.0 ml/min, σύμφωνα με την ακόλουθη διαβάθμιση χρονοδιάγραμμα: σε χρόνο μηδέν, 95% A και 5% B, μετά από 45 λεπτά, οι αντλίες ρυθμίστηκαν σε 85% A και 15% B, στα 60 min, σε 65% A και 35% B, στα 65 min, σε 50% A και 50% B, και τέλος στα 70 min, σε 100% B. Αυτή η διαδικασία ακολουθήθηκε από μια περίοδο εξισορρόπησης 30 λεπτών πριν από την έγχυση του επόμενου δείγματος. Η ανάλυση παρακολουθήθηκε σε μήκη κύματος των 280, 320, και 360 nm ταυτόχρονα. Τρία πανομοιότυπα πειράματα διεξήχθησαν για κάθε δείγμα που εξετάστηκε. Οι κορυφές αναγνωρίστηκαν με σύγκριση χρόνου κατακράτησης και των UV-vis φασμάτων με τις ενώσεις αναφοράς, και τα δεδομένα ποσοτικοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τις αντίστοιχες καμπύλες των ενώσεων αναφοράς ως πρότυπα. Όλα τα πρότυπα διαλύθηκαν σε μεθανόλη.

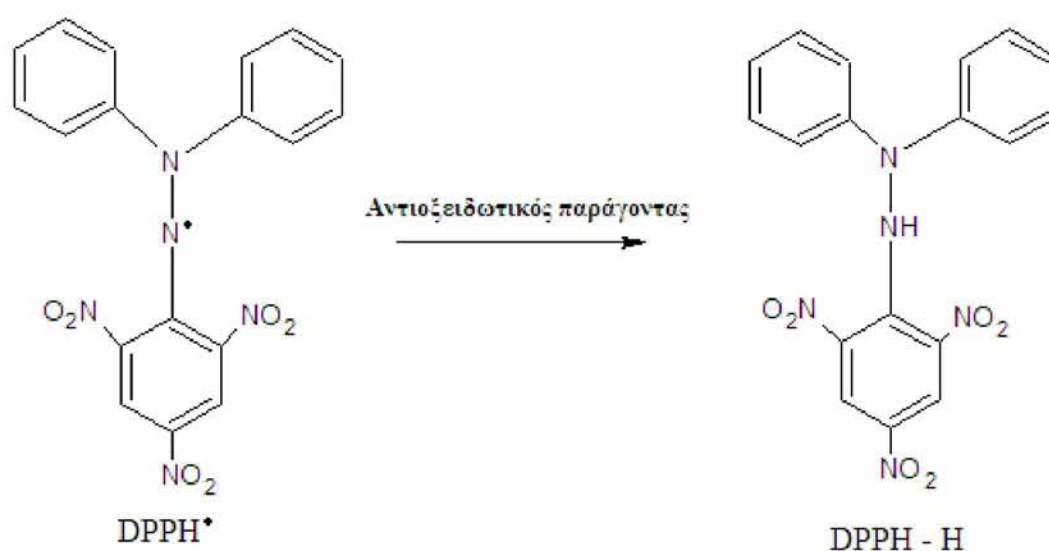
#### **4.2.2.γ. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH•**

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω της δέσμευσης της σταθερής ρίζας DPPH• πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Brad-Williams et al. (Brad-Williams et al., 1995). Η μέθοδος που εφαρμόστηκε αποτελεί μια παραλλαγή της αρχικής μεθόδου και είναι μια από τις πιο χαρακτηριστικές και

απλές μεθόδους για την αρχική εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ισχύος αντιοξειδωτικών μορίων ή φυτικών εκχυλισμάτων πλούσιων σε ενώσεις με αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Η εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας βασίζεται στην αλληλεπίδραση των εξεταζόμενων μορίων ή φυτικών εκχυλισμάτων με την σταθερή ρίζα 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH<sup>•</sup>). Η ρίζα DPPH<sup>•</sup> μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (SET) είτε ενός ατόμου υδρογόνου (HAT) (Prior et al., 2005). Είναι μια σταθερή οργανική ρίζα αζώτου η οποία έχει μωβ χρώμα και απορροφά στα 517 nm. Όταν στο διάλυμα της ρίζας προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε το 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλυδραζύλιο (DPPH<sup>•</sup>) ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) και μετατρέπεται σε 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλυδραζίνη (DPPH-H) η οποία έχει κίτρινο χρώμα, με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται (εικόνα 39).

Πιο αναλυτικά, για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων, των κλασμάτων και των καθαρών πολυφαινολικών ενώσεων, η αντίδραση με την ρίζα πραγματοποιείται σε τελικό όγκο 1 ml, στο οποίο περιέχονται μεθανόλη (διαλύτης), 100 μM ρίζας DPPH<sup>•</sup> και το εκχύλισμα, το κλάσμα και η καθαρή πολυφαινολική ένωση (δείγμα) σε διαφορετικές αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Μετά την προσθήκη των συστατικών της αντίδρασης τα δείγματα ανακινούνται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 20 min. Ακολουθεί μέτρηση της οπτικής απορρόφησης στα 517 nm. Σε κάθε πείραμα το εξεταζόμενο εκχύλισμα, διαλυμένο σε μεθανόλη, αποτελούσε το τυφλό και η ρίζα DPPH<sup>•</sup> (100 μM) σε μεθανόλη αποτελούσε το μάρτυρα. Ο μηδενισμός του φασματοφωτόμετρου γίνεται με 1 ml μεθανόλης. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις

τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα για το κάθε εκχύλισμα που εξετάστηκε.



Εικόνα 39. Χημική δομή της ένωσης 1,1 διφαινυλ-2-πικρυλδραζύλιο (DPPH<sup>•</sup>) καθώς και της ανηγμένης της μορφής 1,1-διφαινυλ-2-πικρυλδραζίνη (DPPH-H).

Η συγκέντρωση (100  $\mu\text{M}$ ) της ρίζας επιλέχθηκε μετά από κατασκευή καμπύλης αναφοράς με την μέτρηση της οπτικής απορρόφησης αυξανόμενων συγκεντρώσεων DPPH<sup>•</sup> (5, 10, 20, 40, 80, 100  $\mu\text{M}$ ) σε μεθανόλη. Η συγκέντρωση 100  $\mu\text{M}$  βρίσκεται στο γραμμικό κομμάτι της καμπύλης και δίνει τιμή οπτικής απορρόφησης ικανοποιητική για την παρατήρηση της μείωσής της μετά την προσθήκη αντιοξειδωτικού παράγοντα. Οι διαλύτες μεθανόλη και DMSO δεν επηρεάζουν τη μέθοδο.

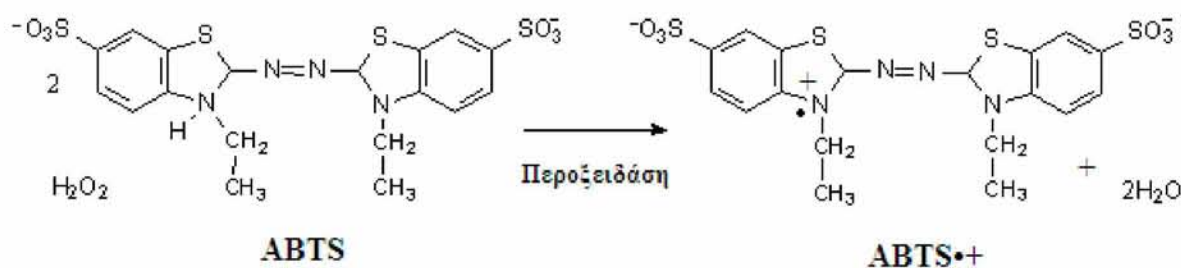


#### 4.2.2.δ. Εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μέσω αλληλεπίδρασης με την ρίζα $ABTS^{\bullet+}$

Η μέθοδος εκτίμησης της αντιοξειδωτικής ικανότητας, βασισμένη στην ικανότητα αλληλεπίδρασης με την ρίζα  $ABTS^{\bullet+}$  (κατιόν) πραγματοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Miller και Rice-Evans (Miller et al., 1993). Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης των προς εξέταση αντιοξειδωτικών παραγόντων με την ρίζα  $ABTS^{\bullet+}$  είναι όμοιος με εκείνον της ρίζας  $DPPH^{\bullet}$ , η οποία μπορεί να αδρανοποιηθεί είτε μέσω προσθήκης ενός ηλεκτρονίου (SET) είτε μέσω προσθήκης ενός ατόμου υδρογόνου (HAT) (Prior et al., 2005). Ωστόσο σε αντίθεση με την ρίζα  $DPPH^{\bullet}$ , η οποία βρίσκεται ως σταθερή ρίζα εξαρχής, η ρίζα  $ABTS^{\bullet+}$  πρέπει να παραχθεί από την οξείδωση του 2,2'-Azino-bis-(3-ethyl-benzthiazoline-sulphonic acid) (ABTS). Έτσι για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας μιας ουσίας πρέπει πρώτα να προηγηθεί ο σχηματισμός της ρίζας  $ABTS^{\bullet+}$  και να ακολουθήσει η προσθήκη της προς εξέτασης ουσίας. Η προσθήκη του αντιοξειδωτικού παράγοντα γίνεται μετά την παραγωγή της ρίζας  $ABTS^{\bullet+}$  για να αποφευχθεί η αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών παραγόντων με τους οξειδωτικούς παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την οξείδωση του ABTS.

Η οξείδωση του ABTS γίνεται είτε μέσω χημικών αντιδράσεων με διάφορα αντιδραστήρια, είτε μέσω δράσης ενζύμων όπως περοξειδασών (Cano et al., 1998; Arnao et al., 2001). Η ρίζα  $ABTS^{\bullet+}$  από την στιγμή που σχηματίζεται είναι σταθερή, έχει πράσινο χρώμα και απορροφά στα 730 nm. Όταν στο διάλυμα προστεθεί μια ουσία με αντιοξειδωτική δράση τότε η ρίζα  $ABTS^{\bullet+}$  ανάγεται με την προσθήκη ενός ατόμου υδρογόνου (ή ηλεκτρονίου) με αποτέλεσμα η οπτική απορρόφηση να ελαττώνεται. Για την εκτίμηση της αντιοξειδωτικής ικανότητας των δειγμάτων η

οξείδωση του ABTS πραγματοποιήθηκε ενζυμικά μέσω της δράσης μιας περοξειδάσης, της HRP, παρουσία  $H_2O_2$  (εικόνα 40). Η δημιουργία της ρίζας πραγματοποιείται σε όγκο 1 ml στο οποίο περιέχονται 1 mM ABTS, 30  $\mu M$   $H_2O_2$  και 6  $\mu M$  περοξειδάση. Αμέσως μετά την προσθήκη του ενζύμου τα δείγματα αναδεύονται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου στο σκοτάδι για 45 min (εμφάνιση πράσινου χρώματος). Μετά το πέρας της επώασης στα αντίστοιχα δείγματα προστίθενται οι συγκεντρώσεις του εξεταζόμενου δείγματος. Στο μάρτυρα μετά τη δημιουργία της ρίζας δεν προστίθενται τίποτα. Σε κάθε πείραμα το εξεταζόμενο δείγμα μόνο του σε  $H_2O$  με 1 mM ABTS, 30  $\mu M$   $H_2O_2$  αποτελούσε το τυφλό. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα για το καθένα. Οι διαλύτες μεθανόλη και DMSO δεν επηρεάζουν τη μέθοδο.



Εικόνα 40. Χημική δομή και ενζυμική παραγωγή της ρίζας  $ABTS^{\bullet+}$  μέσω της δράσης της περοξειδάσης.

#### 4.2.2.ε. Προσδιορισμός αναγωγικής ικανότητας

Η αναγωγική ικανότητα προσδιορίστηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Yen & Duh (1994). Η αναγωγική ικανότητα μιας ουσίας σχετίζεται με την αντιοξειδωτική της ικανότητα και αποτελεί έναν αξιόπιστο δείκτη της. Ενώσεις με αναγωγική

ικανότητα υποδεικνύουν ότι είναι δότες ηλεκτρονίων και μπορούν να ανάγουν οξειδωμένα ενδιάμεσα της λιπιδικής υπεροξειδωσης, έτσι ώστε να δράσουν ως αρχικές ή δευτερεύουσες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Στη μέθοδο αυτή, ουσίες, που μπορεί να έχουν κάποια αναγωγική ικανότητα, αντιδρούν με τον  $\text{Fe}^{3+}$  και τον ανάγουν σε  $\text{Fe}^{2+}$ , όπου όταν αντιδρά με τον χλωριούχο σίδηρο δίνει ένα σύμπλοκο το οποίο απορροφά στα 700 nm. Το κίτρινο χρώμα του εξεταζόμενου διαλύματος αλλάζει σε αποχρώσεις του πράσινου και του μπλε ανάλογα με την αναγωγική ικανότητα της εξεταζόμενης ουσίας. Όσο μεγαλύτερη είναι η απορρόφηση στα 700nm, τόσο μεγαλύτερη είναι και η αναγωγική ικανότητα.

Πιο αναλυτικά, τα εκχυλίσματα διαλύθηκαν σε phosphate buffer (0,2M, pH 6,6) σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Προστέθηκαν 2,5 ml από το διάλυμα του δείγματος μας σε 2,5 ml potassium ferricyanide (1%) και τα δείγματα μας επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 50 °C για 20 λεπτά. Ακολουθεί μεταφορά τους στον πάγο για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, προστίθενται 2,5 ml TCA (10%) και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στα 3000 rpm για 10 λεπτά στους 25°C. Στο υπερκείμενο (2,5 ml) προστίθενται 2,5 ml απιονισμένου νερού και 500 μl χλωριούχου σιδήρου (0,1 %) και ακολουθεί επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα ακολουθεί η μέτρηση της απορρόφησης στα 700 nm. Επίσης, ελέγχθηκε αν τα εκχυλίσματα απορροφούσαν στις εξεταζόμενες συγκεντρώσεις στα 700 nm. Κάθε δείγμα εξετάστηκε εις τριπλούν και πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον δύο πειράματα.

#### 4.2.3. Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος ανάλυσης SPSS 13.0 (Statistical Package for Social Sciences, SPSS). Για τη στατιστική ανάλυση υπολογιζόταν αρχικά για κάθε δείγμα η

μέση τιμή (mean), η τυπική απόκλιση (standard deviation) και το τυπικό σφάλμα (standard error).

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε μέσω ανάλυσης διακύμανσης ενός παράγοντα, 1-way ANOVA. Οι ζευγαρωτές συγκρίσεις έγιναν μέσω του τεστ του Tukey. Οι διαφορές θεωρήθηκαν στατιστικά σημαντικές με επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας  $p < 0,05$ . Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως mean  $\pm$  SEM.

#### **4.2.4. Συνθήκες κυτταρικής καλλιέργειας**

Τα κύτταρα EA.hy926 ήταν ένα δώρο από τον καθηγητή Κουκούλη (Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Λάρισα, Ελλάδα) και τα μυϊκά κύτταρα C2C12 ήταν ένα δώρο από τον καθηγητή Κουτσιλιέρη (Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα). Όλα τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φυσιολογικά DMEM, που περιείχαν 10% (v/v) FBS, 2 mM L-γλουταμίνη, 100 U/ml πενικιλίνης και 100 U/ml στρεπτομυκίνης (όλα από την Gibco, Paisley, UK) σε πλαστικές φλάσκες καλλιέργειας μίας χρήσης στους 37 °C σε 5% διοξείδιο του άνθρακα.

#### **4.2.5. Προσδιορισμός της κυτταρικής βιωσιμότητας**

Οι επιδράσεις των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιού στη βιωσιμότητα των κυττάρων εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας το kit δοκιμασίας XTT (Roche Diagnostics), όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο 2). Εν συντομία, τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε πλάκα 96-φρεατίων με  $1 \times 10^4$  κύτταρα ανά φρεάτιο σε DMEM. Μετά από 24 ώρες επώασης, τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με αυξανόμενες συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων σε DMEM ελεύθερο FBS για 24 ώρες. Ένα σύνολο 50  $\mu$ l διαλύματος δοκιμής XTT, το οποίο παρασκευάστηκε με

ανάμιξη 50  $\mu$ l αντιδραστηρίου επισήμανσης XTT με 1  $\mu$ l αντιδραστηρίου σύζευξης ηλεκτρονίου, προστέθηκε στη συνέχεια σε κάθε φρεάτιο. Μετά από 4 ώρες επώασης, η απορρόφηση μετρήθηκε στα 450 nm και στα 690 nm επίσης ως μήκος κύματος αναφοράς σε ένα Bio-Tek EL  $\times$  800 αναγνώστη μικροπλάκας (Winooski, VT, USA). DMEM ελεύθερο ορού FBS χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Επιπλέον, η απορρόφηση κάθε συγκέντρωσης εκχυλίσματος βοστρύχων σε DMEM μέσω ελεύθερο ορού FBS και ελέγχθηκε στα 450 nm. Οι τιμές απορρόφησης από τα εκχυλίσματα βοστρύχων αφαιρέθηκαν από εκείνα που προέρχονται από κύτταρα επεξεργασμένα με εκχυλίσματα βοστρύχων. Τα δεδομένα υπολογίζονται ως ποσοστό της αναστολής της βιωσιμότητας χρησιμοποιώντας τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{αναστολή (\%)} = [(OD \text{ έλεγχος} - \text{δείγμα OD}) / OD \text{ ελέγχου}] \times 100,$$

όπου ο έλεγχος OD και το δείγμα OD δείχνουν την οπτική πυκνότητα του αρνητικού ελέγχου και δοκιμασμένου ουσίες, αντίστοιχα. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν εις τριπλούν και τουλάχιστον σε 2 διαφορετικά πειράματα.

#### **4.2.6. Επεξεργασία των κυττάρων EA.hy926 και C2C12 με τα εκχυλίσματα βοστρύχων σταφυλιού**

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας και επωάστηκαν για 24 h σε επωαστικό κλίβανο. Το θρεπτικό μέσο στη συνέχεια απομακρύνθηκε και αντικαταστάθηκε με θρεπτικό μέσο χωρίς ορό FBS που περιέχει τα εκχυλίσματα βοστρύχων σταφυλιού σε μη-κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις. Δεδομένου ότι ένας από τους κύριους σκοπούς της μελέτης ήταν να εξεταστούν τα αποτελέσματα της πολυφαινολικής σύστασης στην αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων, οι επιλεγμένες συγκεντρώσεις και για τα τρία εξεταζόμενα εκχυλίσματα είχαν το ίδιο

συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο και εκφράστηκαν ως «μg πολυφαινολών /ml ». Έτσι, οι επιλεγμένες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 0,20 μg πολυφαινολών / ml για τα κύτταρα EA.hy926 και 0,95 μg πολυφαινολών / ml για τα κύτταρα C2C12. Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τα εκχυλίσματα για 24 ώρες και στη συνέχεια σε επεξεργασία με θρυψίνη, συγκεντρώθηκαν και φυγοκεντρήθηκαν δύο φορές στα 300 x g για 10 λεπτά στους 5 °C. Στο τέλος της πρώτης φυγοκέντρησης, το υπερκείμενο υγρό απορρίφθηκε και το κυτταρικό ίζημα επαναιωρήθηκε σε PBS. Μετά τη δεύτερη φυγοκέντρηση, το κυτταρικό ίζημα συλλέγεται και χρησιμοποιείται για τη μέτρηση των επιπέδων των δεικτών οξειδωτικού στρες, γλουταθειόνη (GSH), ROS, ουσίες που αντιδρούν με το θειοβαρβιτουρικό οξύ (TBARS) και πρωτεϊνικά καρβονύλια (CARB).

#### **4.2.7. Ανάλυση κυτταρομετρίας ροής για τον προσδιορισμό των επιπέδων της GSH και των ROS**

Τα ενδοκυτταρικά επίπεδα της GSH και των ROS αξιολογήθηκαν με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας τις χρωστικές mercury orange και DCF-DA, αντίστοιχα όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Ειδικότερα, το φθορίζον πορτοκαλί υδράργυρος συνδέεται άμεσα με GSH, ενώ DCF-DA εντός κυττάρων αποακετυλιώνεται από εστεράσες, και περαιτέρω μετατρέπεται σε φθορίζοντα DCF από την οξειδωτική δράση των ROS. Ένα διάλυμα 400 μM stock mercury orange παρασκευάστηκε σε ακετόνη και αποθηκεύτηκε στους 4 °C, ενώ ένα φρέσκο διάλυμα της DCF-DA 400 μM παρασκευάστηκε σε μεθανόλη. Για την εκτίμηση των επιπέδων GSH και ROS, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε PBS σε  $1 \times 10^6$  κύτταρα ανά ml και επωάζονται παρουσία των χρωστικών mercury orange (40 μM) ή DCF-DA (10 μM) στο σκοτάδι στους 37 °C για 30 min. Τα κύτταρα στη συνέχεια

πλένονται, επαναιωρούνται σε PBS και υποβλήθηκαν σε ανάλυση κυτταρομετρίας ροής με τη χρήση ενός κυτταρομέτρου ροής FACScan (Becton-Dickinson, Franklin Lakes NJ, USA) με μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής στα 488 και 530 nm για ROS, και 488 και 580 nm για GSH αντίστοιχα. Τα κύτταρα αναλύθηκαν σε ένα ρυθμό ροής 1.000 γεγονότων ανά δευτερόλεπτο. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν σε 10.000 κύτταρα ανά δείγμα και η ένταση φθορισμού μετρήθηκε σε λογαριθμική κλίμακα. Τα δεδομένα αναλύθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό BD Cell Quest (Becton-Dickinson). Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον 3 φορές.

#### **4.2.8. Αξιολόγηση των επιπέδων TBARS με φασματοφωτομετρία**

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων των TBARS, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε PBS σε αναλογία  $1 \times 10^6$  κύτταρα / ml. Στη συνέχεια, μια ελαφρώς τροποποιημένη δοκιμασία από την περιγραφόμενη στη μελέτη του Keles et al. (2001) χρησιμοποιήθηκε όπως περιγράφηκε προηγουμένως (Κεφάλαιο 2). 400  $\mu$ l κυτταρικού εναιωρήματος ή 400  $\mu$ l PBS για το τυφλό αναμίχθηκε με 500  $\mu$ l 35% TCA και 500  $\mu$ l tris (υδροξυμεθυλ) αμινομεθανίου (Tris-HCl) (200 mM, pH 7,4) και επωάστηκαν για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, 1 ml διαλύματος που αποτελείται από 2M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  και 55 mM θειοβαρβιτουρικού οξέος προστέθηκαν και τα δείγματα επωάστηκαν στους 95 °C για 45 λεπτά. Τα δείγματα ψύχθηκαν στον πάγο για 5 λεπτά και αναδεύτηκαν μετά την προσθήκη 1 ml 70% TCA. Τα δείγματα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000g για 3 λεπτά και η απορρόφηση του υπερκειμένου αναγνώστηκε στα 530 nm. Η δοκιμασία απαιτεί απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης άνω των 30  $\mu$ g στο δοκιμαζόμενο δείγμα. Η συνολική συγκέντρωση πρωτεΐνης στο κυτταρικό εναιώρημα αναλύθηκε χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο Bradford από την Sigma-Aldrich. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των TBARS

βασίστηκε στη μοριακή απορρόφηση του συντελεστή μαλonoδιαλδεϋδης. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον 3 φορές.

#### **4.2.9. Αξιολόγηση των επιπέδων CARB με φασματοφωτομετρία**

Για τον προσδιορισμό των επιπέδων των πρωτεϊκών καρβονυλίων, τα κύτταρα επαναιωρήθηκαν σε PBS σε αναλογία  $1 \times 10^6$  κύτταρα / ml και στη συνέχεια λύθηκαν με υπερήχους. Μια τροποποιημένη μέθοδος όπως περιγράφεται στην μελέτη του Patsoukis και συν., (2004) χρησιμοποιήθηκε όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Εν συντομία, 200  $\mu$ l 20% TCA προστέθηκαν σε 200  $\mu$ l κυτταρολύματος, και αυτό το μίγμα επώαστηκε σε ένα λουτρό πάγου για 15 λεπτά και φυγοκεντρήθηκε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο κλάσμα απορρίπτεται. Επιπλέον, 500  $\mu$ l 10 mM 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH, σε 2,5 N HCl) για το δείγμα ή 500  $\mu$ l 2,5 N HCl για το τυφλό προστέθηκαν στο ίζημα. Τα δείγματα επωάζονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα, με διακοπτόμενη ανάμιξη κάθε 15 λεπτά και φυγοκεντρήθηκαν στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο κλάσμα απορρίπτεται και 1 ml από 10% TCA προστέθηκε στο ίζημα που αναμείχθηκε και φυγοκεντρήθηκε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Το υπερκείμενο κλάσμα απορρίπτεται και 1 ml διαλύματος αιθανόλης-οξικού αιθυλεστέρα (1:1 v/v) προστέθηκε, αναδεύτηκε και φυγοκεντρήθηκε στα 15.000 g για 5 λεπτά στους 4 °C. Αυτό το στάδιο έκπλυσης επαναλήφθηκε δύο φορές. Το κλάσμα υπερκείμενου απορρίφθηκε, και 1 ml ουρίας 5 M (pH 2.3) προστέθηκε, αναδεύτηκε και επώαστηκε στους 37 °C για 15 λεπτά. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρωση σε 15.000 g για 3 λεπτά στους 4 °C, και η απορρόφηση αναγνώστηκε στα 375 nm. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης πρωτεΐνης καρβονυλίου βασίστηκε στη μοριακή απορρόφηση συντελεστή του DNPH. Η δοκιμασία απαιτεί απόλυτη ποσότητα πρωτεΐνης άνω των



30  $\mu\text{g}$  στο εξεταζόμενο δείγμα. Η συνολική συγκέντρωση των πρωτεϊνών του πλάσματος αξιολογήθηκε χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία Bradford. Κάθε πείραμα επαναλήφθηκε τουλάχιστον 3 φορές.

#### **4.2.10. Στατιστική ανάλυση**

Τα δεδομένα αναλύθηκαν με μονόδρομη ανάλυση ANOVA που ακολουθείται από δοκιμή του Tukey για πολλαπλές συγκρίσεις κατά ζεύγη. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε στο  $p < 0,05$ . Για όλες τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό SPSS, έκδοση 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Τα δεδομένα παρουσιάζονται ως μέσο  $\pm$  το SEM.

### **4.3. Αποτελέσματα**

#### **4.3.1. Πολυφαινολική σύσταση των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιού**

Το συνολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο (TPC) και η σύσταση των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων που προσδιορίστηκε με HPLC, παρουσιάζονται στον πίνακα 4. Οι τιμές του TPC ήταν παρόμοιες μεταξύ των τριών εκχυλισμάτων και κυμαίνονταν από 357 έως 378 mg γαλλικού οξέος / g ξηρού εκχυλίσματος. Αυτές οι τιμές TPC ήταν παρόμοιες με εκείνες που παρατηρήθηκαν σε μία από τις προηγούμενες μελέτες (Apostolou et al., 2013). Επιπλέον, όπως έχει δείχθει προηγουμένως σε άλλα εκχυλίσματα βοστρύχων σταφυλιού (Apostolou et al., 2013; Anastasiadi et al., 2009), τα εκχυλίσματα περιείχαν διαφορετικές κατηγορίες πολυφαινολών, όπως φαινολικά οξέα (δηλαδή, το γαλλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το κουμαρικό οξύ, φερουλικό οξύ και συριγγικό οξύ), φλαβονόλες [(+) - κατεχίνη και (-) - επικατεχίνη], φλαβονόλες (κερκετίνη, ρουτίνη και καμφερόλη) και στίλβενια (trans-ρεσβερατρόλη) (πίνακας 4). Τα ποσά ορισμένων πολυφαινολών δεν διέφεραν

σημαντικά μεταξύ των τριών εκχυλίσμάτων. Αυτές οι πολυφαινόλες ήταν το συριγγικό οξύ (13,60 έως 17,44 mg/g ξηρού εκχυλίσματος), (+) - κατεχίνη (8,49 έως 12,49 mg/g εκχυλίσματος) και ρουτίνη (12,06 έως 15,93 mg/g ξηρό εκχύλισμα) (πίνακας 4). Ωστόσο, οι ποσότητες των άλλων πολυφαινολών, παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών εξεταζόμενων εκχυλίσμάτων. Έτσι, οι διαφορές τους ήταν έως 3,6 φορές για το γαλλικό οξύ (7,39 έως 26,96 mg/g αποξηραμένου εκχυλίσματος), 4,2 φορές για το καφεϊκό οξύ (0,54 έως 2,32 mg/g ξηρού εκχυλίσματος), 1,9 φορές για την (-) - επικατεχίνη (9,83 έως 19,13 mg/g ξηρού εκχυλίσματος), 2,1 φορές για το κουμαρικό οξύ (0,60 έως 1,31 mg/g ξηρού εκχυλίσματος), 3,7 φορές για το φερουλικό οξύ (0,97 έως 3,59 mg/g ξηρού εκχυλίσματος), 3,5 φορές για την trans-ρεσβερατρόλη (5,97 έως 21,43 mg/g ξηρού εκχυλίσματος), 4,3 φορές για την κερκετίνη (3,94 έως 17,33 mg/g ξηρού εκχυλίσματος) και 4,9-φορές για την καμφερόλη (0,74 - 3,63 mg/g ξηρού εκχύλισμα) (πίνακας 4).

Πίνακας 4. Πολυφαινολική σύσταση των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών.

Ποικιλία σταφυλιού Μαυροτράγανο Μανδηλαριά Μοσχόμαυρο			
Γαλλικό οξύ	11.48 <sup>a</sup>	26.96 <sup>a</sup>	7.39 <sup>a</sup>
Συριγγικό οξύ	17.44	13.60	15.98
Καφεϊκό οξύ	0.54	2.32	0.64
(+)-Κατεχίνη	12.18	12.49	8.49
(-)-Επικατεχίνη	19.13	9.83	12.63
Κουμαρικό οξύ	0.75	1.31	0.60
Φερουλικό οξύ	3.59	4.10	0.97
Ρουτίνη	15.93	12.06	14.81
<i>trans</i> -ρεσβερατρόλη	9.09	21.43	5.97
Κερκετίνη	3.94	17.33	8.01
Καμφερόλη	0.74	3.63	1.83
TPC <sup>b</sup>	357	378	373

<sup>a</sup> Όλες οι τιμές εκφράζονται ως mg/g ξηρού εκχυλίσματος. <sup>b</sup> TPC, ολικό πολυφαινολικό περιεχόμενο εκφραζόμενο ως mg γαλλικού οξέος/g ξηρού εκχυλίσματος.

#### 4.3.2. Εξουδετέρωση των ελεύθερων ριζών

Όλα τα εκχυλίσματα εξετάστηκαν για την ικανότητά τους να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα εκχυλίσματα εξουδετέρωναν τις ρίζες DPPH<sup>•</sup> και ABTS<sup>+</sup> με έναν δοσο-εξαρτώμενο τρόπο σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις (εικόνα 41A και 41B). Προκειμένου να συγκριθεί η αποτελεσματικότητα εξουδετέρωσης των ριζών από τα εκχυλίσματα, η τιμή IC<sub>50</sub> υποδεικνύει τη συγκέντρωση που προκάλεσε την εξουδετέρωση του 50% των ριζών DPPH<sup>•</sup> και ABTS<sup>+</sup>. Τα γραφήματα δημιουργήθηκαν ώστε να φαίνεται το ποσοστό

σάρωσης της ρίζας συγκριτικά με τη συγκέντρωση εκχυλίσματος. Οι τιμές IC<sub>50</sub> που υπολογίστηκαν από τη δοκιμασία σάρωσης της ρίζας DPPH ήταν με την ακόλουθη σειρά: εκχύλισμα Μανδηλαριά ( $2,8 \pm 0,2$  μg πολυφαινόλες / ml) > εκχύλισμα Μαυροτράγανο ( $3,6 \pm 0,17$  μg πολυφαινόλες / ml) > εκχύλισμα Μοσχόμαυρο ( $6,5 \pm 0,23$  μg πολυφαινόλες / ml ) (πίνακας 5). Στη δοκιμασία εξουδετέρωσης της ρίζας ABTS η σειρά δραστηριότητας των εκχυλισμάτων με βάση τις τιμές IC<sub>50</sub> ήταν: εκχύλισμα Μανδηλαριά ( $0,42 \pm 0,08$  μg πολυφαινόλες / ml) > εκχύλισμα Μαυροτράγανο ( $0,71 \pm 0,10$  μg πολυφαινόλες / ml) > εκχύλισμα Μοσχόμαυρο ( $0,90 \pm 0,11$  μg πολυφαινόλες / ml) (πίνακας 5).

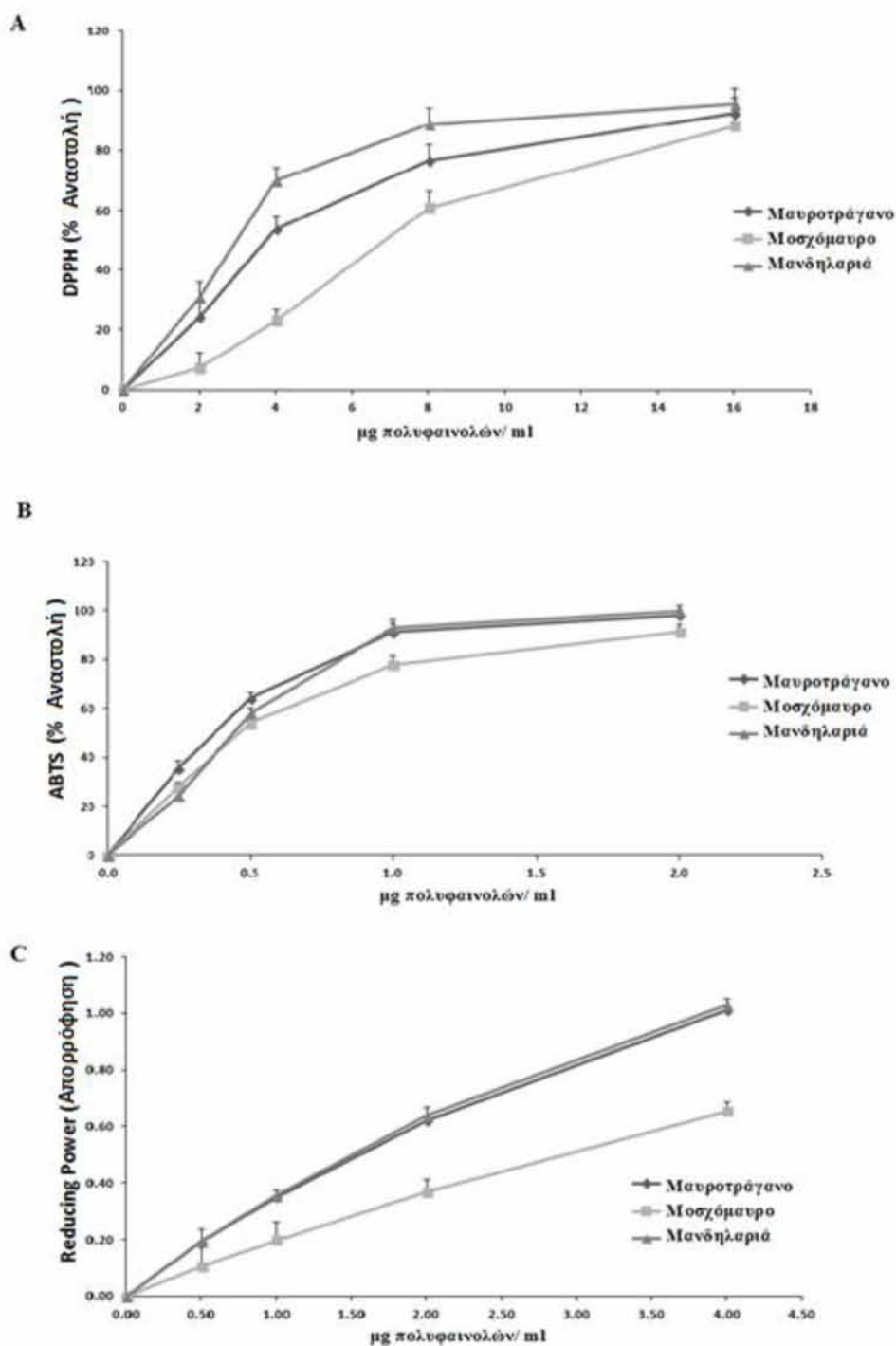
#### **4.3.3. Reducing Power**

Για τη δοκιμασία Reducing Power το προσδιορίστηκε RP<sub>0.5</sub>AU, δηλαδή η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε μια απορρόφηση 0,5 στα 700 nm, (εικόνα 41C). Οι τιμές RP<sub>0.5</sub>AU των δοκιμαζόμενων εκχυλισμάτων με την ακόλουθη σειρά: εκχύλισμα Μανδηλαριά ( $1,46 \pm 0,12$  μg πολυφαινόλες / ml) > εκχύλισμα Μαυροτράγανο ( $1,47 \pm 0,21$  μg πολυφαινόλες / ml) > εκχύλισμα Μοσχόμαυρο ( $2,92 \pm 0,23$  μg πολυφαινόλες / ml) (πίνακας 5).

Πίνακας 5. Δραστικότητα σάρωσης ελευθέρων ριζών έναντι των ριζών DPPH<sup>•</sup> και ABTS<sup>•+</sup> καθώς επίσης και η αναγωγική ισχύς των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών.

Ποικιλία σταφυλιού,	DPPH <sup>•a</sup> IC <sub>50</sub> <sup>b</sup>	ABTS <sup>•+b</sup> IC <sub>50</sub> <sup>b</sup>	Reducing power <sup>a</sup> RP <sub>0.5AU</sub> <sup>b</sup>
Μανδηλαριά	2.8±0.2	0.42±0.08	1.46±0.12
Μαυροτράγανο	3.6±0.17	0.71±0.10	1.47±0.21
Μοσχόμαυρο	6.5±0.23	0.90±0.11	2.92±0.23

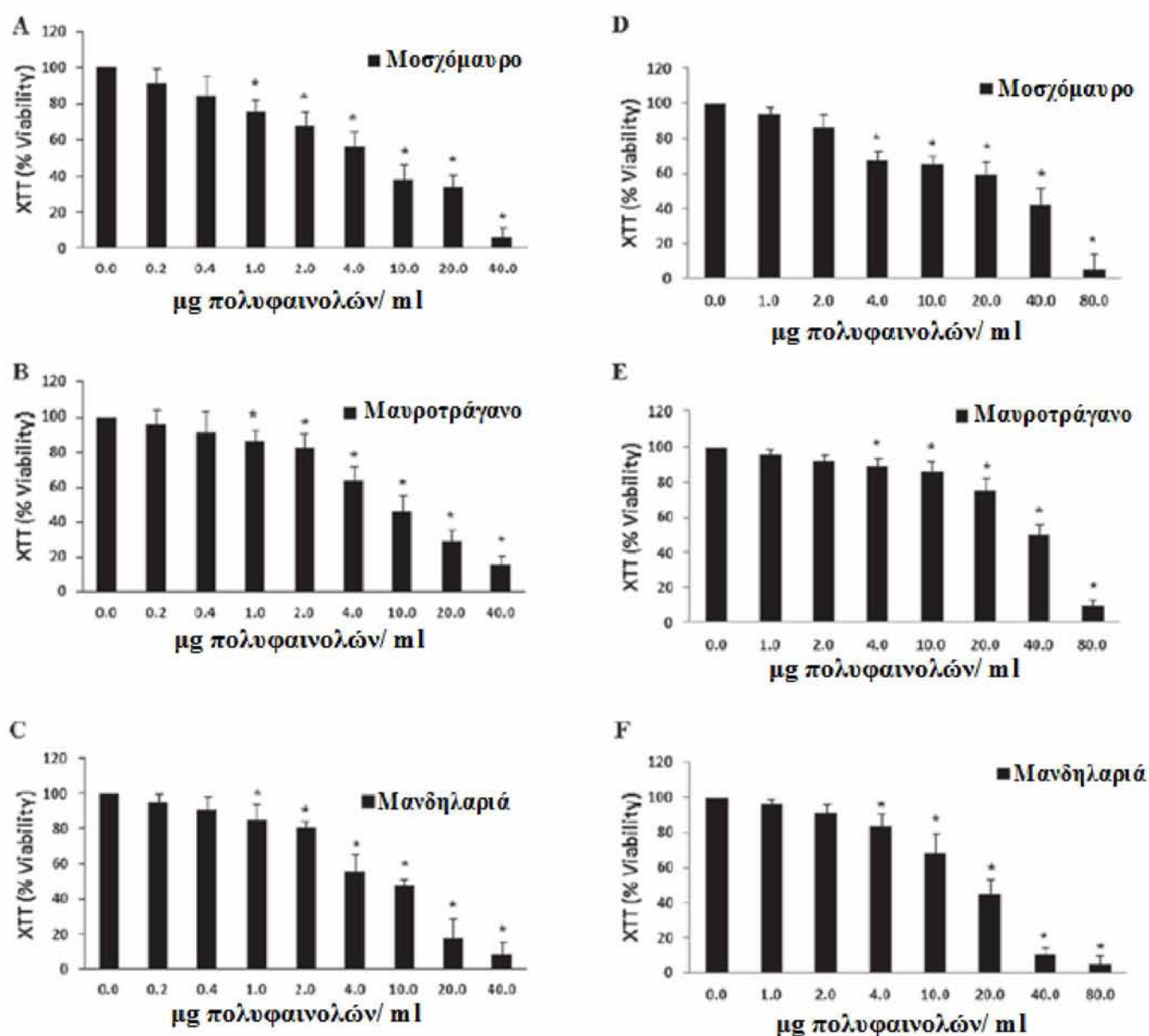
<sup>a</sup> Οι τιμές εκφράζονται ως means ± SEM και προέκυψαν από τουλάχιστον τρία ανεξάρτητα πειράματα. <sup>b</sup> Οι τιμές IC<sub>50</sub> και RP<sub>0.5AU</sub> εκφράζονται ως µg of polyphenols/ml. DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), διαμωνιακό άλας.



Εικόνα 41. (Α) Ποσοστό δραστικότητα σάρωσης της ρίζας 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH'), (Β) Ποσοστό δραστικότητα σάρωσης της ρίζας 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS<sup>++</sup>) και (Γ) αναγωγική δύναμη των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών από τις ποικιλίες Μαυροτράγανο, Μοσχόμαυρο και Μανδηλαριά. Οι τιμές παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  SEM.

#### **4.3.4. Επιπτώσεις της χορήγησης των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών στη βιωσιμότητα των κυττάρων C2C12 και EA.hy926**

Η μέθοδος XTT χρησιμοποιήθηκε για να αξιολογήσει τις επιπτώσεις των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών στη βιωσιμότητα των κυττάρων C2C12 και EA.hy926 για να επιλεγούν μη κυτταροτοξικές συγκεντρώσεις για χρήση στα πειράματά μας. Τα αποτελέσματα αποκάλυψαν ότι τα τρία εκχυλίσματα εμφάνισαν κυτταροτοξικότητα σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 1  $\mu\text{g}$  πολυφαινόλων / ml στα κύτταρα EA.hy926 και μεγαλύτερες από 4  $\mu\text{g}$  πολυφαινόλων / ml στα κύτταρα C2C12 (εικόνα 42). Έτσι, οι συγκεντρώσεις που επελέγησαν ήταν 0,20 και 0,95  $\mu\text{g}$  πολυφαινόλες / ml για τα κύτταρα EA.hy926 και C2C12, αντίστοιχα.



Εικόνα 42. Η βιωσιμότητα των κυττάρων μετά από την χορήγηση των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών από τις ποικιλίες Μαυροτράγανο, Μοσχόμαυρο και Μανδηλαριά. (A-C) στα EA.hy926 κύτταρα και (D-F) στα C2C12 κύτταρα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται ως μέσοι όροι  $\pm$  SEM τριών ανεξάρτητων πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. \*  $p < 0,05$  υποδεικνύει σημαντική διαφορά από την τιμή ελέγχου.

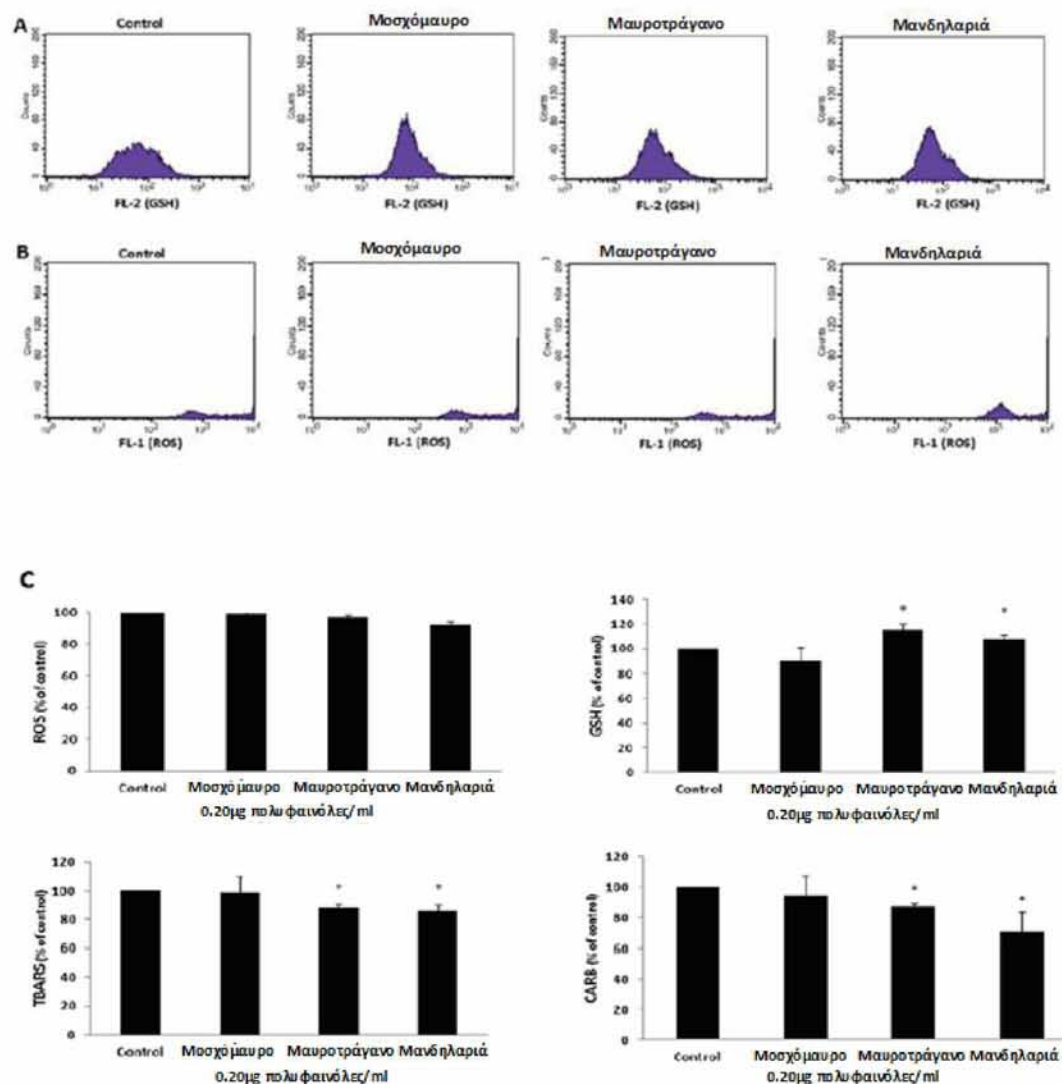


#### **4.3.5. Επίδραση της χορήγησης των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών στα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες σε κύτταρα EA.hy926**

Τα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες μετρήθηκαν προκειμένου να εκτιμηθούν οι επιπτώσεις των εκχυλισμάτων στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων EA.hy926. Τα επίπεδα των ROS και της GSH μετρήθηκαν με κυτταρομετρία ροής χρησιμοποιώντας τις χρωστικές DCF-DA και mercury orange, αντίστοιχα. Τα ιστογράμματα που καταδεικνύουν τις μετρήσεις κυττάρων έναντι του φθορισμού των χρωστικών φαίνεται στο εικόνα 43A και B, αντίστοιχα. Οι τιμές της μέσης έντασης φθορισμού αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας το λογισμικό BD Cell Quest και εκφράζονται ως ποσοστό των κυττάρων ελέγχου (μη επεξεργασμένα κύτταρα). Κανένα από τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα δεν είχε οποιαδήποτε επίδραση στα επίπεδα των ROS (εικόνα 43C). Επιπλέον, τα Μαυροτράγανο και Μανδηλαριά εκχυλίσματα αύξησαν σημαντικά τα επίπεδα της GSH κατά  $20,2 \pm 1,5$  και  $15,8 \pm 4,1\%$ , αντίστοιχα, σε σύγκριση με τους μάρτυρες (εικόνα 43C). Αντίθετα, το εκχύλισμα Μοσχόμαυρο δεν επηρέασε τα επίπεδα της γλουταθειόνης.

Επιπλέον, η υπεροξείδωση των λιπιδίων και η οξείδωση των πρωτεϊνών αξιολογήθηκαν φασματοφωτομετρικά με μέτρηση των επιπέδων των TBARS και CARB, αντίστοιχα (εικόνα 43C). Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα Μανδηλαριά μείωσε σημαντικά την υπεροξείδωση των λιπιδίων κατά  $14,8 \pm 2,3\%$  σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, το εκχύλισμα Μαυροτράγανο μείωσε την υπεροξείδωση των λιπιδίων κατά  $12,5 \pm 1,9\%$ , ενώ το εκχύλισμα Μοσχόμαυρο δεν είχε καμία επίδραση. Παρόμοια με την λιπιδική υπεροξείδωση, η χορήγηση του εκχυλίσματος Μανδηλαριά άσκησε το πιο σημαντική μείωση των επιπέδων των CARB κατά  $25,9 \pm 6,3\%$  (εικόνα

43C). Το εκχύλισμα Μαυροτράγανο μείωσε τα επίπεδα των CARB κατά  $16,6 \pm 1,3\%$  ενώ το εκχύλισμα Μοσχόμαυρο δεν είχε καμία επίδραση.

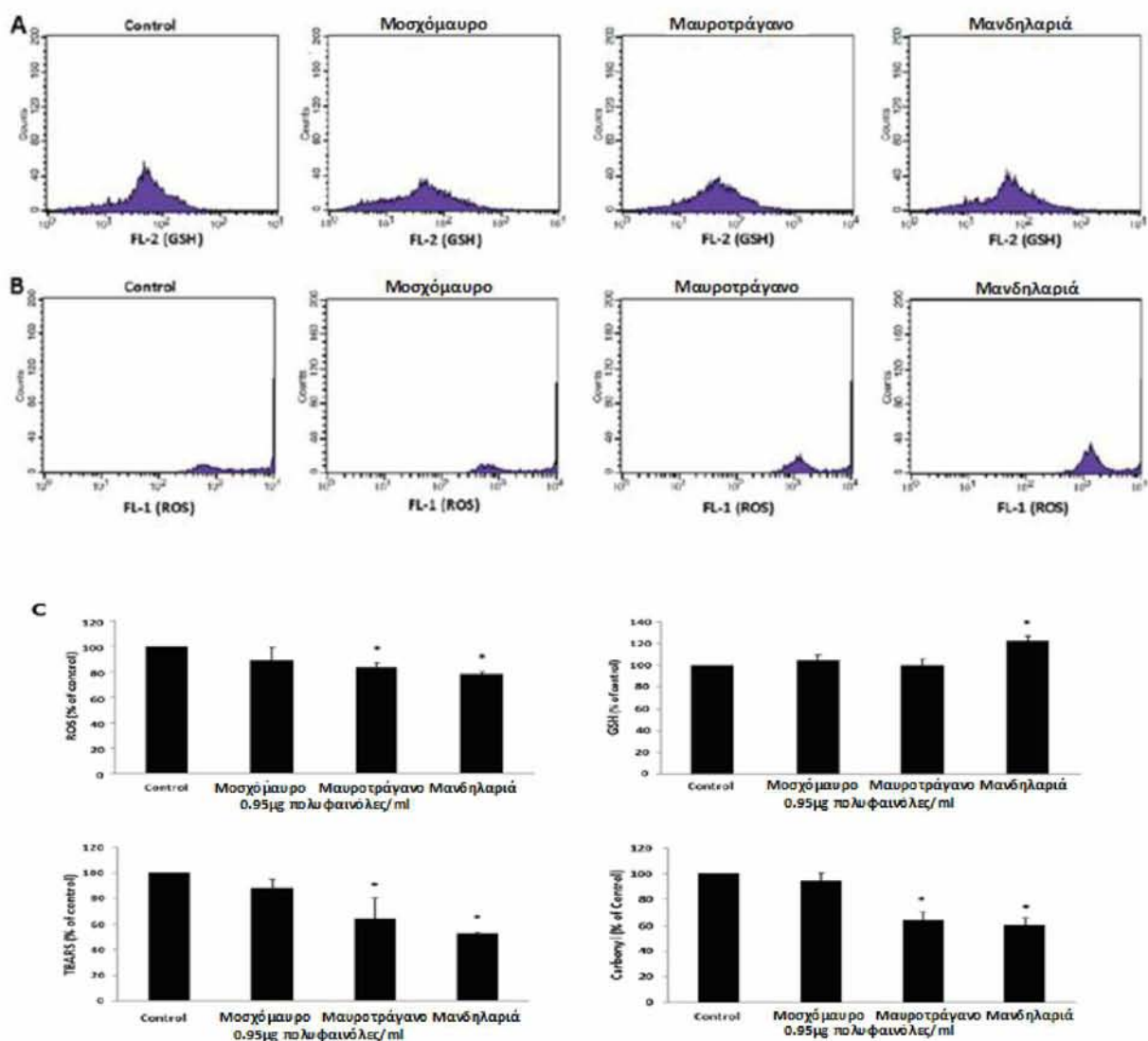


Εικόνα 43. Επίδραση της χορήγησης των εκχυλισμάτων βοστρύχων για 24 h στα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες στα κύτταρα EA.hy926. (Α) Το ιστογράμμο του αριθμού των κυττάρων έναντι του φθορισμού που αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση της γλουταθειόνης (GSH). (Β) Τα ιστογράμματα του αριθμού των κυττάρων έναντι του φθορισμού που αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση των επιπέδων των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS). (Γ) Επιδράσεις στα επίπεδα των ROS, GSH, TBARS και CARB. Τα επίπεδα των TBARS και των CARB αξιολογήθηκαν με φασματοφωτομετρία. Όλες οι τιμές παρουσιάζονται ως οι μέσες τιμές  $\pm$  SEM τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. \*  $p < 0,05$  υποδεικνύει σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου.

#### **4.3.6. Επίδραση της χορήγησης εκχυλίσματος βοστρύχων σταφυλιών στα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες σε κύτταρα C2C12**

Τα ιστογράμματα που καταδεικνύουν τις μετρήσεις κυττάρων έναντι του φθορισμού mercury orange ή DCF-DA στα κύτταρα C2C12 μετά τη χορήγηση εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών φαίνονται στην εικόνα 44A και 44B, αντίστοιχα. Τα Μανδηλαριά και Μαυροτράγανο εκχυλίσματα μείωσαν σημαντικά τα επίπεδα των ROS κατά  $21,8 \pm 2$  και  $16,5 \pm 3,7\%$ , αντίστοιχα, ενώ το εκχύλισμα Μοσχόμαυρο δεν είχε καμία επίδραση (εικόνα 44C). Τέλος, το εκχύλισμα Μανδηλαριά παρουσιάζει σημαντικά αυξημένα τα επίπεδα γλουταθειόνης κατά  $22,6 \pm 4,5\%$  σε σύγκριση με την ομάδα ελέγχου, ενώ τα άλλα δύο εκχυλίσματα δεν είχαν καμία επίδραση στα επίπεδα της γλουταθειόνης (εικόνα 44C).

Επιπλέον, το εκχύλισμα Μανδηλαριά μείωσε σημαντικά τα επίπεδα των TBARS κατά  $47,3 \pm 1,2\%$ , και το εκχύλισμα Μαυροτράγανο κατά  $36,2 \pm 9,6\%$ , ενώ το εκχύλισμα Μοσχόμαυρο δεν είχε καμία επίδραση σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου, στα κύτταρα C2C12 (εικόνα 44C). Επιπλέον, το εκχύλισμα Μανδηλαριά άσκησε τη μεγαλύτερη μείωση στα επίπεδα των CARB, μειώνοντάς τα κατά  $39,0 \pm 5,1\%$  (εικόνα 44C). Το εκχύλισμα Μαυροτράγανο μείωσε τα επίπεδα CARB κατά  $35,9 \pm 7,1\%$  και το εκχύλισμα Μοσχόμαυρο δεν είχε καμία επίδραση στα επίπεδα τους (εικόνα 44C).



Εικόνα 44. Επίδραση της χορήγησης των εκχυλισμάτων βοστρύχων για 24 h στα επίπεδα των δεικτών οξειδωτικού στρες στα κύτταρα C2C12. (A) Το ιστόγραμμα του αριθμού των κυττάρων έναντι του φθορισμού που αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση της γλουταθειόνης (GSH). (B) Τα ιστογράμματα των κυττάρων έναντι του φθορισμού που αναλύθηκαν με κυτταρομετρία ροής για την ανίχνευση των επιπέδων των δραστικών ειδών οξυγόνου (ROS). (Γ) Επιδράσεις στα επίπεδα των ROS, GSH, TBARS και CARB. Τα επίπεδα των TBARS και των CARB αξιολογήθηκαν χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο. Όλες οι τιμές παρουσιάζονται ως οι μέσες τιμές  $\pm$  SEM τριών ανεξάρτητων πειραμάτων. \*  $p < 0,05$  υποδεικνύει σημαντική διαφορά σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου.

#### 4.4. Συζήτηση

Τα εκχυλίσματα σταφυλιών και το κρασί παρουσιάζουν έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, λόγω των ευεργετικών επιδράσεών τους στην ανθρώπινη υγεία (Bagchi et al., 2014). Για παράδειγμα, συμπληρώματα διατροφής με την ονομασία «εκχύλισμα σπόρων σταφυλιού» (Grape seed extract) καταναλώνονται ευρέως σε όλο τον κόσμο και αποτελούν από τα περισσότερο χρησιμοποιούμενα διατροφικά συμπληρώματα. Ωστόσο, η πλειοψηφία των μελετών σχετικά με σταφύλια αναφέρονται σε εκχυλίσματα από γίγαρτα, φλούδες και στέμφυλα (Feringa et al., 2011; Sri Harsha et al., 2015). Αξίζει να σημειωθεί, ότι σε προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας, αποδείχθηκε ότι οι βόστρυχοι σταφυλιού, ένα υπο-προϊόν που παράγεται σε μεγάλες ποσότητες (περίπου 5% του αρχικού υλικού σταφυλιών) κατά τη διάρκεια της διαδικασίας οινοποίησης, περιείχε βιοενεργά φυτοχημικά και παρουσίασε σημαντικές βιολογικές λειτουργίες (Apostolou et al., 2013; Stagos et al., 2014). Ειδικότερα, αποδείχθηκε ότι τα εκχυλίσματα βοστρύχων σταφυλιών παρουσίασαν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση *in vitro* συγκρίσιμη ακόμα και με εκείνη των εκχυλισμάτων σπόρων σταφυλιού (Apostolou et al., 2013). Στην παρούσα μελέτη, διερευνήθηκε σε κυτταρικό επίπεδο (δηλαδή, στα ενδοθηλιακά και στα μυϊκά κύτταρα) η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών από ελληνικές ποικιλίες σταφυλιών.

Πριν από την εξέταση των επιπτώσεων των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων, αξιολογήθηκε δραστηριότητα τους έναντι ελευθέρων ριζών *in vitro*. Όπως αποδείχθηκε, επίσης, σε προηγούμενη μελέτη (Apostolou et al., 2013), στην παρούσα μελέτη, τα εξεταζόμενα εκχυλίσματα βοστρύχων σταφυλιών παρουσίασαν πολύ ισχυρή δράση έναντι ριζών

των DPPH και ABTS. Και στις δύο δοκιμασίες DPPH και ABTS, το εκχύλισμα Μανδηλαριά ήταν το πιο ισχυρό και το Μοσχόμαυρο ήταν το πιο αδύναμο. Έτσι, αν και τα τρία εξεταζόμενα εκχυλίσματα είχαν παρόμοιες τιμές TPC, την ικανότητά τους να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες ποικίλλει σε μεγάλο βαθμό. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα Μανδηλαριά ήταν σχεδόν 2 φορές πιο ισχυρό έναντι της ρίζας DPPH<sup>•</sup> και της ρίζας ABTS<sup>+</sup> από το εκχύλισμα Μοσχόμαυρο. Αυτή η ασυμφωνία μεταξύ των τιμών TPC και δράση έναντι των ελευθέρων ριζών είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα μιας προηγούμενης μελέτης κατά την οποία οι τιμές TPC δώδεκα εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών είχαν μια ασθενή συσχέτιση με την ικανότητα σάρωσης των ελευθέρων ριζών (Apostolou et al., 2013). Αυτή η έλλειψη συσχέτισης μεταξύ των τιμών TPC και την ικανότητα σάρωσης των ελευθέρων ριζών υποδεικνύει ότι η ποιοτική σύσταση των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών μπορεί να είναι πιο σημαντική από ποσοτική περιεκτικότητά τους σε πολυφαινολικές όσον αφορά την αντιοξειδωτική τους ικανότητα. Για παράδειγμα, έχει προταθεί ότι πολυφαινολικά εκχυλίσματα που εμφανίζουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση έχουν υψηλή περιεκτικότητα ειδικών πολυφαινολών, όπως trans-ρεσβερατρόλη, γαλλικό οξύ, κερκετίνη, (+) - κατεχίνη, (-) - επικατεχίνη και ρουτίνη, και έτσι μπορεί ενδεχομένως να δεσμεύουν τις ελεύθερες ρίζες πριν αυτές είναι σε θέση να οξειδώσουν και να καταστρέψουν άλλα μακρομόρια (Alov et al., 2015; Li et al., 2014; Yoshimura, 2014). Πράγματι, το εκχύλισμα Μανδηλαριά περιείχε τουλάχιστον 2 φορές μεγαλύτερες ποσότητες trans-ρεσβερατρόλης, γαλλικού οξέος και κερκετίνης από εκχύλισμα Μοσχόμαυρο.

Επιπλέον, εξετάστηκε η αναγωγική ισχύς των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών. Η αναγωγική ισχύς μιας ουσίας σχετίζεται με αντιοξειδωτική της δράση,

δεδομένου ότι δείχνει ότι οι ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι ηλεκτρονιοδότες και μπορούν να μειώσουν τα οξειδωμένα ενδιάμεσα των διαδικασιών υπεροξειδωσης των λιπιδίων, έτσι ώστε να μπορούν να ενεργούν ως πρωτογενή αλλά και δευτερογενή αντιοξειδωτικά (Chanda and Dave, 2009). Και τα τρία εκχυλίσματα βοστρύχων σταφυλιών έδειξαν αυξημένη αναγωγική ισχύ σε αυξανόμενες συγκεντρώσεις. Όπως και στις δοκιμασίες σάρωσης των ελευθέρων ριζών, το εκχύλισμα Μανδηλαριά παρουσίασε τη μεγαλύτερη αναγωγική ισχύ, ακολουθούμενο από το εκχύλισμα Μαυροτράγανο. Και πάλι, παρατηρήθηκε ότι, εκτός από τις παρόμοιες τιμές TPC των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών, τα εκχυλίσματα Μανδηλαριά και Μαυροτράγανο παρουσίασαν 2-φορές μεγαλύτερη αναγωγική ισχύ από το εκχύλισμα Μοσχόμαυρο. Αυτή η διαφορά μπορεί να αποδοθεί στις διαφορές στη πολυφαινολική σύσταση των δοκιμαζόμενων εκχυλισμάτων. Για παράδειγμα, μια προηγούμενη μελέτη ανέφερε ότι οι προανθοκυανιδίνες, μια κατηγορία ολιγομερών φλαβονοειδών, εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών ήταν τα κυρίως υπεύθυνα μόρια για τη αναγωγική δράση τους και πιθανόν αυτό να οφείλεται στο σχετικά υψηλό αριθμό των ομάδων υδροξυλίου που περιέχουν οι μονομερείς μονάδες τους (Karvela et al., 2009).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στην παρούσα μελέτη, η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών εξετάστηκε επίσης σε κυτταρικό επίπεδο, ειδικά σε ενδοθηλιακά και μυϊκά κύτταρα. Στην προηγούμενη μελέτη,δείχτηκε ότι εκχύλισμα στεμφύλων σταφυλιού βελτίωσε την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων EA.hy926 και C2C12. Τα στέμφυλα είναι επίσης ένα παραπροϊόν της διαδικασίας οινοποίησης, αλλά περιλαμβάνει, εκτός από τους βοστρύχους, τους σπόρους και τις φλούδες των σταφυλιών. Αυτή είναι η πρώτη εργασία που μελέτησε τις επιπτώσεις της χορήγησης εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών στην



οξειδοαναγωγική κατάσταση των ενδοθηλιακών και μυϊκών κυττάρων. Δύο από τις εξεταζόμενα εκχυλίσματα, τα Μανδηλαριά και Μαυροτράγανο, βελτίωσαν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ενδοθηλιακών και μυϊκών κυττάρων, δεδομένου ότι μειώθηκε η υπεροξείδωση των λιπιδίων, όπως φαίνεται από τη μείωση των επιπέδων TBARS. Επιπλέον, τα εκχυλίσματα Μανδηλαριά και Μαυροτράγανο προκάλεσαν μείωση της οξείδωσης των πρωτεϊνών, όπως φαίνεται από την μείωση στα επίπεδα των CARB στα κύτταρα EA.hy926 και C2C12. Ωστόσο, το εκχύλισμα Μοσχόμαυρο ήταν το μόνο από τα εξετασθέντα εκχυλίσματα που δεν μείωσε τα επίπεδα των CARB και των TBARS σε σύγκριση με τα κύτταρα ελέγχου και στα κύτταρα EA.hy926 και στα C2C12.

Η μείωση της οξείδωσης των πρωτεϊνών και της υπεροξείδωσης των λιπιδίων από τα εκχυλίσματα Μανδηλαριά και Μαυροτράγανο μπορούν να αποδοθούν στην ικανότητά τους να μειώνουν τα επίπεδα των ROS, κυρίως στα μυϊκά κύτταρα. Η άμεση δράση έναντι των ελεύθερων ριζών σάρωσης και η αναγωγική ικανότητα των εκχυλισμάτων Μανδηλαριά και Μαυροτράγανο μπορεί να ευθύνονται τουλάχιστον εν μέρει για την ικανότητά τους να μειώνουν τα επίπεδα των ROS στα μυϊκά κύτταρα. Αντιθέτως, τα δύο αυτά τα εκχυλίσματα δεν επηρέασε τα επίπεδα των ROS στα ενδοθηλιακά κύτταρα EA.hy926, και αυτό πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις των εκχυλισμάτων που χρησιμοποιούνται σε αυτά τα κύτταρα ήταν χαμηλότερες από αυτές που χρησιμοποιούνται στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Το εκχύλισμα Μοσχόμαυρο δεν μετέβαλε τα επίπεδα των ROS ούτε τα ενδοθηλιακά ούτε στα μυϊκά κύτταρα. Αξίζει να σημειωθεί ότι, το εκχύλισμα Μοσχόμαυρο ήταν επίσης το λιγότερο ισχυρό εκχύλισμα έναντι των ελεύθερων ριζών και παρουσίασε την μικρότερη αναγωγική δύναμη.

Η μείωση της ROS-επαγόμενης βλάβης των λιπιδίων και των πρωτεϊνών από τα εκχυλίσματα Μανδηλαριά και Μαυροτράγανο στα ενδοθηλιακά κύτταρα μπορεί επίσης να εξηγηθεί από την ικανότητά τους να ενισχύουν τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, όπως την GSH. Ωστόσο, στα μυϊκά κύτταρα, μόνο το εκχύλισμα Μανδηλαριά αύξησε τα επίπεδα της GSH, υποδεικνύοντας ότι το εκχύλισμα αυτό ήταν πιο ισχυρό για την επαγωγή της GSH. Επίσης το εκχύλισμα Μοσχόμαυρο, το οποίο δεν μείωσε τα επίπεδα των TBARS, CARB και ROS δεν ήταν σε θέση να αυξήσει τα επίπεδα της GSH είτε στα ενδοθηλιακά ή στα μυϊκά κύτταρα. Η αύξηση στα επίπεδα της GSH από τα εκχυλίσματα βοστρύχων σταφυλιού έχει ιδιαίτερη σημασία, δεδομένου ότι η GSH, που αποτελεί την πιο άφθονη πηγή μη πρωτεϊνικής θειόλης στα κύτταρα, είναι ένα από τα σημαντικότερα ενδοκυτταρικά αντιοξειδωτικά μόρια που τα προστατεύουν έναντι του οξειδωτικού στρες (Livingstone and Davis, 2007). Στην προηγούμενη μελέτη (Κεφάλαιο 2),δείχτηκε ότι η GSH είναι ένα μόριο κλειδί για την αντιοξειδωτική δράση του εκχυλίσματος στεμφύλων τόσο στα κύτταρα EA.hy926 όσο και στα κύτταρα C2C12. Συγκεκριμένα, το εκχύλισμα στεμφύλων αύξησε τα επίπεδα της GSH και την έκφραση ή τη δραστικότητα των ενζύμων που εμπλέκονται στη σύνθεση (γ-γλουταμυλκυστεΐνη συνθεάση) και τον μεταβολισμό (π.χ., S-τρανσφεράση γλουταθειόνης) της GSH.

Τα αποτελέσματα από την αξιολόγηση των δεικτών οξειδωτικού στρες έδειξαν, ότι υπήρχαν διαφορές στην αποτελεσματικότητα των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών στην οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων. Αυτές οι διαφορές των εκχυλισμάτων οφείλονται στη πολυφαινολική τους σύσταση. Αυτό το συμπέρασμα υποστηρίζεται από το γεγονός ότι οι συγκεντρώσεις όλων των τριών εκχυλισμάτων είχαν τις ίδιες τιμές TPC στα πειράματα που

πραγματοποιήθηκαν στα κύτταρα. Έτσι, αποκλείεται το γεγονός ότι οι παρατηρούμενες διαφορές στην αντιοξειδωτική δράση μεταξύ των εκχυλισμάτων μπορεί να οφείλεται στο διαφορετικό ποσό τους σε πολυφαινόλες. Μεταξύ των εξεταζόμενων εκχυλισμάτων, το εκχύλισμα Μοσχόμαυρο παρουσίασε πολύ μικρότερη ισχύ στη βελτίωση της οξειδοαναγωγής κατάστασης των κυττάρων σε σύγκριση με τα εκχυλίσματα Μανδηλαριά και Μαυροτράγανο. Το εκχύλισμα Μοσχόμαυρο είχε επίσης λιγότερες ποσότητες γαλλικού οξέος, (+) - κατεχίνης, φερουλικού οξέος και trans-ρεσβερατρόλης από τα εκχυλίσματα Μανδηλαριά και Μαυροτράγανο, κι έτσι αυτές οι πολυφαινόλες μπορούν να αντιπροσωπεύουν, τουλάχιστον εν μέρει, για την υψηλότερη αντιοξειδωτική δράση αυτών των δυο εκχυλισμάτων. Για παράδειγμα, μια προηγούμενη μελέτη έδειξε ότι η trans-ρεσβερατρόλη αυξάνει τα επίπεδα της GSH και μειώνει το οξειδωτικό στρες που προκαλείται από ενδοκυτταρική παραγωγή ROS και μηλονοδιαλδεϋδης (MDA) σε λεία αγγειακά μυϊκά κύτταρα (Guo et al., 2014). Το γαλλικό οξύ έχει επίσης αποδειχθεί ότι μειώνει τα επίπεδα των ROS στα λεία αγγειακά μυϊκά κύτταρα και τον αντίστοιχο p47phox μεσολαβητής τους, ένα μόριο που μετατοπίζεται στην μεμβράνη και να επάγει τη παραγωγή  $O_2^{\bullet-}$  (Yang et al., 2014). Επιπλέον, σε κύτταρα λείου αγγειακού μυός αρουραίου, το φερουλικό οξύ έχει αποδειχθεί ότι μειώνει την υπεροξείδωση των λιπιδίων και αυξάνει τη δραστηριότητα των αντιοξειδωτικών ενζύμων (π.χ., δισμουτάση υπεροξειδίου) (Wu et al., 2009). Μεταξύ των εκχυλισμάτων Μανδηλαριά και Μαυροτράγανο, το πρώτο εμφανίζει πιο ισχυρή αντιοξειδωτική δράση. Όσον αφορά τις διαφορές στη πολυφαινολική σύσταση μεταξύ αυτών των δύο εκχυλισμάτων, το Μανδηλαριά είχε υψηλότερες ποσότητες σε καφεϊκό οξύ, κουμαρικό οξύ, κερκετίνη και καμφερόλη. Μεταξύ αυτών των πολυφαινολών, το καφεϊκό οξύ έχει αναφερθεί να μειώνει τα επίπεδα του  $O_2^{\bullet-}$  σε

πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (100-1000 nM) σε ανθρώπινα ενδοθηλιακά κύτταρα ομφάλιας φλέβας υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες (Migliori et al., 2015). Επιπλέον, η κερκετίνη και η καμφερόλη έχειδειχθεί ότι τα επίπεδα του  $O_2^{\bullet-}$  σε λεία μυϊκά αγγειακά κύτταρα επίμυνων μέσω της αναστολής της δραστηριότητας της NADPH-οξειδάσης, την κύρια πηγή παραγωγής του  $O_2^{\bullet-}$  στο τοίχωμα του αγγείου (Jimenez et al., 2015).

Εν κατακλείδι, τα ευρήματα της παρούσας μελέτης δείχνουν για πρώτη φορά ότι τα εκχυλίσματα βοστρύχων σταφυλιών σε χαμηλές συγκεντρώσεις βελτιώνουν την οξειδοαναγωγική κατάσταση των ενδοθηλιακών και μυϊκών κυττάρων. Ως εκ τούτου, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα εκχυλίσματα βοστρύχων σταφυλιών, για παράδειγμα, στην ανάπτυξη των αντιοξειδωτικών συμπληρωμάτων διατροφής που να χρησιμοποιούνται για την εξουδετέρωση του οξειδωτικού στρες που προκαλείται από παθολογικές συνθήκες στο ενδοθήλιο ή στους σκελετικούς μύες. Ωστόσο, φάνηκε ότι η αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών εξαρτάται από την ποιοτική σύσταση των πολυφαινολών τους. Για παράδειγμα, σημαντικές ποσότητες πολυφαινολών, όπως trans-ρεσβερατρόλη, γαλλικό οξύ, (+) - κατεχίνη, φερουλικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, κερκετίνη, κουμαρικό οξύ και καμφερόλη μπορεί να είναι απαραίτητη για την παρατηρούμενη αντιοξειδωτική δράση των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών. Η γνώση της πολυφαινολικής σύστασης που είναι υπεύθυνη για την ισχυρή αντιοξειδωτική δράση θα βοηθήσει στην αξιολόγηση της ποιότητας των εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιών που προορίζονται για χρήσεις όπως αντιοξειδωτικά συμπληρώματα.

## ***ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5***

***Μελέτη της επίδρασης εκχυλίσματος στεμφύλων  
σταφυλιών στην γονιδιακή έκφραση μυικών κυττάρων  
με χρήση DNA μικροσυστοιχιών (DNA Microarrays)***

## 5.1. Γενικά

Στις προηγούμενες μελέτες που παρουσιάζονται στα παραπάνω κεφάλαια δείχθηκε ότι το εκχυλίσματα στεμφύλων σταφυλιών την τοπικής ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου ενίσχυσε την αντιοξειδωτική άμυνα των μυϊκών κυττάρων της σειράς C2C12. Αυτό φάνηκε αρχικά από την ικανότητά του να μειώνει τους δείκτες οξειδωτικού στρες ενώ παράλληλα αύξανε τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης, ενός σημαντικού ενδογενούς αντιοξειδωτικού. Επίσης φάνηκε ότι είχε την ικανότητα να επηρεάζει τα επίπεδα και τη δραστικότητα συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών ενζύμων. Συγκεκριμένα η GCS και η GST ήταν τα ένζυμα που επηρεάστηκαν περισσότερο καθώς αυξήθηκαν τα επίπεδα της πρώτης και η δραστικότητα της δεύτερης έπειτα από 12 και 18 ώρες επώασης με το εκχύλισμα, αντίστοιχα. Πρόκειται για δύο ένζυμα που σχετίζονται άμεσα με τον μεταβολισμό της γλουταθειόνης. Η δράση αυτή του εκχυλίσματος ήταν παρόμοια και στις δύο συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν (2,5 και 10  $\mu\text{g/ml}$ ). Επίσης, μελέτες έχουν δείξει ότι εκχυλίσματα στεμφύλων σταφυλιού καθώς και μεμονωμένες ανθοκυανίνες προερχόμενες από σταφύλια μπορούν να επηρεάσουν την γονιδιακή έκφραση μιας πληθώρας γονιδίων σε λευκοκύτταρα σκύλου, καθώς και σε ηπατοκύτταρα και μυϊκά κύτταρα ποντικών (Lefevre et al., 2008; Yunoki et al., 2008). Συμπεραίνεται λοιπόν ότι οι πολυφαινόλες έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν με κυτταρικούς σηματοδοτικούς μηχανισμούς επηρεάζοντας την γονιδιακή έκφραση.

Έτσι, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξεταστεί η επίδραση του εκχυλίσματος στεμφύλων σταφυλιού από την ποικιλία Μπατίκι Τυρνάβου στη γονιδιακή έκφραση των μυϊκών κυττάρων ποντικού C2C12 με τη χρήση DNA μικροσυστοιχιών για να διερευνηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων

ασκείται η αντιοξειδωτική δράση σε αυτά τα κύτταρα. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η επίδραση στη γονιδιακή έκφραση των κυττάρων C2C12 μετά από επώαση με το εκχύλισμα συγκέντρωσης 2,5  $\mu\text{g/ml}$  για 16 ώρες. Αυτό έγινε γιατί παρατηρήθηκε προηγουμένως ότι η συγκέντρωση αυτή ήταν η μικρότερη χρησιμοποιούμενη που βελτίωσε την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων και έπειτα από 12 ώρες επώασης είχε επηρεάσει ήδη τα επίπεδα αντιοξειδωτικών ενζύμων. Επίσης εξετάστηκε αν στις 16 ώρες επώασης είχαν επηρεαστεί τα επίπεδα της ανηγμένης γλουταθειόνης.

## **5.2. Υλικά και Μέθοδοι**

### **5.2.1. Προετοιμασία του εκχυλίσματος**

Το εκχύλισμα στέμφυλων σταφυλιού που εξέτασε άνηκε στην ποικιλία Μπατίκι Τυρνάβου (μια ερυθρή ποικιλία σταφυλιών που καλλιεργούνται στην Κεντρική Ελλάδα) του γένους *Vitis vinifera*. Η απομόνωση του εκχυλίσματος διεξήχθη όπως περιγράφηκε στα προηγούμενα κεφάλαια (Κεφάλαιο 2).

### **5.2.2. Συνθήκες καλλιέργειας κυττάρων**

Τα μυϊκά κύτταρα C2C12 ήταν δώρο από τον καθηγητή Κουτσίλιερη (Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, Ελλάδα). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε τροποποιημένο μέσο κανονικό Dulbecco Eagle (DMEM), που περιέχει 10% (v/v) εμβρυϊκό βόειο ορό (FBS), 2 mM L-γλουταμίνη, 100 U/ml πενικιλίνης και 100 U/ml στρεπτομυκίνης (όλα από την Gibco, Paisley, UK) σε

πλαστικά φλάσκες καλλιέργειας κυττάρων μιας χρήσεως στους 37 °C σε 5% διοξείδιο του άνθρακα.

### **5.2.3. Κατεργασία των κυττάρων με εκχύλισμα στέμφυλων**

Τα κύτταρα C2C12 καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας και επώστηκαν για 24 h. Το θρεπτικό μέσο στη συνέχεια απομακρύνθηκε και αντικαταστάθηκε με μέσο χωρίς FBS που περιέχει εκχύλισμα στέμφυλων στη μη-κυτταροτοξική συγκέντρωση των 2,5 µg/ml και ακολούθησε επώαση για 15 ώρες. Στην προηγούμενη μελέτη, αποδείχθηκε ότι αυτή η συγκέντρωση ήταν μη-κυτταροτοξική για τα κύτταρα C2C12. Επίσης παρουσίαζε προστατευτική δράση έναντι του οξειδωτικού παράγοντα tBHP. Μη επεξεργασμένα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες. Το πείραμα επαναλήφθηκε δύο φορές.

### **5.2.4. Απομόνωση RNA από τα κύτταρα C2C12 μετά από επώασή τους με το εκχύλισμα στεμφύλων σταφυλιού της ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου**

Μετά την αποκόλληση των C2C12 κυττάρων με τρυψίνη 0,25% και την επαναιώρησή τους σε θρεπτικό υλικό με 10% FBS, και καλλιέργειά τους σε τριβλία (100 mm). Στα κύτταρα προσθέτουμε θρεπτικό υλικό με 10% FBS (Fetal Bovine Saline) και τα επωάζουμε για 24 ώρες στους 37°C και σε 5% CO<sub>2</sub> προκειμένου να προσκολληθούν. Μετά την προσκόλληση των κυττάρων αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό και προσθέτουμε συγκέντρωση του εκχυλίσματος ίση με 2,5 µg/ml σε θρεπτικό υλικό χωρίς FBS συνολικού όγκου 10 ml. Επωάζουμε το εκχύλισμα με τα κύτταρα για 16 ώρες.



Μετά την επώαση των κυττάρων με το εκχύλισμα αφαιρούμε το θρεπτικό υλικό, πλένουμε μία φορά με 3ml PBS (pH 7,4), προσθέτουμε 10 ml PBS και συλλέγουμε τα κύτταρα με cell scraper. Μεταφέρουμε τα κύτταρα σε σωλήνες των 15ml και φυγοκεντρούμε (300g, 5min, 4 °C), διώχνουμε το υπερκείμενο και μεταφέρουμε το ίζημα των κυττάρων σε σωληνάκια των 2 ml. Στη συνέχεια για την απομόνωση του RNA από τα κύτταρα χρησιμοποιήσαμε το RNeasy kit (Invitrogen). Συγκεκριμένα, προσθέτουμε 600 µl buffer RLT και λύουμε τα κύτταρα με ομογενοποιητή (μέγιστη ταχύτητα για 30 sec). Μετά προσθέτουμε ίσο όγκο (600ul) 70% αιθανόλης αποστειρωμένης και ακολουθούμε τα στάδια που περιγράφει το kit. Στο τέλος προσθέτουμε 50µl νερού (RNase free water) και ανάδευση των δειγμάτων για επαναδιάλυση του RNA. Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80 °C μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

#### *Προσδιορισμός συγκέντρωσης και ανάλυση του RNA*

Η ανάλυση και ποσοτικοποίηση του ολικού RNA έγινε με τη χρήση του NanoPhotometer Implen P330 (Thermo Fisher Scientific) και του Agilent 2100 Bioanalyzer. Στον πίνακα 6 φαίνονται οι μετρήσεις των RNA δειγμάτων από την ανάλυση με το NanoDrop 1000 Spectrophotometer.

<b>Δείγματα</b>	<b>Συγκέντρωση RNA ng/μl</b>	<b>Λόγος απορρόφησης 260/280</b>	<b>Λόγος απορρόφησης 260/230</b>
<b>sample 1</b>	423	1,821	1,837
<b>sample 2</b>	496	2,016	2,305
<b>sample 3</b>	356	1,998	2,044
<b>sample 4</b>	416	1,987	1,776

Πίνακας 6: Αποτελέσματα ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης του RNA με τη χρήση του NanoPhotometer Implen P330.

#### **5.2.5. Προσδιορισμός της γονιδιακής έκφρασης με ανάλυση με DNA μικροσυστοιχίες (DNA microarrays analysis) στα κύτταρα C2C12 μετά από επώασή τους με το εκχύλισμα στεμφύλων σταφυλιού της ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου**

##### *Αρχή της μεθόδου*

Οι μικροσυστοιχίες DNA (αλλιώς γνωστές σαν γονιδιακό ή γενωμικό τσιπ, DNA chip είτε διάταξη γονιδίων) είναι μία διάταξη μικροσκοπικών σημείων που αντιπροσωπεύουν μοναδικά γονίδια και ακινητοποιούνται με ομοιοπολικούς δεσμούς σε μία στερεή επιφάνεια (συνήθως γυάλινη). Χρησιμοποιούν DNA για το σύστημα ανίχνευσής τους. Ποσοτικές ή ποιοτικές μετρήσεις με μικροσυστοιχίες

γονιδίων εκμεταλλεύονται την εκλεκτική φύση της αρχής της συμπληρωματικότητας μεταξύ νουκλεϊκών οξέων DNA-DNA ή DNA-RNA ή πρόσφατα και μεταξύ των αμινοξέων των πρωτεϊνών, υπό αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και με τη χρήση φθορίζουσων ουσιών. Με την τεχνολογία των DNA μικροσυστοιχιών και ιδιαίτερα των μεταγραφικών (transcriptomic) μικροσυστοιχιών, μπορούν να προσδιοριστούν ταυτόχρονα τα επίπεδα χιλιάδων mRNA, άρα και τα επίπεδα έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων μέσα σε ένα κύτταρο. Οι μικροσυστοιχίες είναι χρήσιμες σε περιπτώσεις που συγκρίνεται η γονιδιακή έκφραση σε δυο διαφορετικών κυτταρικών τύπων ή σε διαφορετικά είδη ιστών. Επίσης χρησιμοποιούνται σήμερα κατά κόρον για την εξέταση της γονιδιακής έκφρασης υπό ειδικές συνθήκες και για την ανίχνευση νουκλεϊκών οξέων παθογόνων οργανισμών π.χ. επιβλαβών ιών σε δείγματα ελέγχου.

#### *Πειραματική διαδικασία*

Για τον προσδιορισμό της γονιδιακής έκφρασης στα κύτταρα C2C12 μετά από επώασή τους με το εκχύλισμα από στέμφυλα σταφυλίου της ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου, τα RNA δείγματα στάλθηκαν στο κέντρο γενωμικής του Πανεπιστημίου της Οξφόρδης όπου χρησιμοποιήθηκε η τεχνολογία MouseWG-6 v2.0 Expression BeadChip της εταιρείας Illumina. Κάθε μικροσυστοιχία MouseWG-6 v2.0 v4 Expression BeadChip περιέχει περίπου 45200 DNA αλληλουχίες που καλύπτουν μεταγραφικά όλα τα γονίδια του γενώματος του ποντικού, τις περιοχές του στις οποίες πιθανόν να υπάρχουν γονίδια καθώς και ακολουθίες εναλλακτικών μεταγραφημάτων (spliced transcripts).

Για την πειραματική διαδικασία ακολουθήθηκαν τα εξής στάδια:

1. Η συγκέντρωση του RNA στα δείγματα άλλαξε έτσι ώστε να είναι 50 ng/μl. Στη συνέχεια 11 μl από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν για να δημιουργηθεί συμπληρωματικό RNA (cRNA) επισημασμένο με βιοτίνη χρησιμοποιώντας το Illumina® TotalPrep™-96 RNA amplification kit (Ambion, Life Technologies).
2. Στη συνέχεια 1500 ng από το επισημασμένο με βιοτίνη RNA από κάθε δείγμα υβριδοποιήθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο άμεσης υβριδοποίησης για γονιδιακή έκφραση σε ολόκληρο το γένωμα της εταιρείας Illumina, έναντι των μικροσυστοιχιών MouseWG-6 v2.0 Expression BeadChip (Illumina) που είναι σχεδιασμένα για την ανίχνευση 45200 μεταγραφημάτων.
3. Η ποσοτική ανάλυση του φθορισμού από τις μικροσυστοιχίες έγινε με BeadArray scanner (Illumina) και τα δεδομένα αναλύθηκαν με το λογισμικό BeadStudio software.

### **5.3. Αποτελέσματα**

#### **5.3.1. Διαφορές στην έκφραση των γονιδίων (Fold change analysis)**

Λαμβάνοντας ως όριο υπερέκφρασης και υποέκφρασης τις 1,5 φορές, στα μυϊκά κύτταρα C2C12 που επωάστηκαν για 15 ώρες με το εκχύλισμα στεμφύλων σταφυλιού 13 γονίδια υπερεκφράστηκαν και υποεκφράστηκαν 4 γονίδια σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες. Όλα τα γονίδια και η αντίστοιχη υπερέκφραση ή υποέκφραση φαίνονται στον Πίνακα 7. Τη μεγαλύτερη αύξηση στην έκφραση κατά 1,85 φορές την παρουσίασε το γονίδιο *Actg2*. Το γονίδιο με τη δεύτερη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 1,81 φορές ήταν το *Myl9*. Το γονίδιο με την τρίτη μεγαλύτερη

υπερέκφραση κατά 1,76 φορές ήταν το *Acta2*. Την τέταρτη μεγαλύτερη υπερэкφραση εμφάνισε το γονίδιο *Gpr176* κατά 1,75 φορές και την πέμπτη το γονίδιο *Tmem45a* κατά 1,73 φορές. Ακολούθησε το γονίδιο *Mgp* κατά 1,67 φορές. Την έβδομη μεγαλύτερη υπερэкφραση παρουσίασε το γονίδιο *Ogn* κατά 1,60 φορές ακολουθούμενο από το γονίδιο *Crlf1* που υπερεκφράστηκε κατά 1,59 φορές. Την ένατη και την δέκατη μεγαλύτερη υπερэкφραση εμφάνισαν τα γονίδια *Nrep* και *Spon2* κατά 1,58 και 1,57 φορές αντίστοιχα. Ακολούθησαν τα γονίδια *Aqp5* και *Thbs1* που υπερεκφράστηκαν κατά 1,53 φορές. Τέλος την δέκατη τρίτη μεγαλύτερη υπερэкφραση εμφάνισε το γονίδιο *Nnmt* κατά 1,50 φορές. Από τα γονίδια που υποεκφράστηκαν, τη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 1,54 φορές είχε το γονίδιο *Prf1*. Τη δεύτερη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 1,53 φορές το γονιδίου *Sapcd2*. Ακολούθησαν τα γονίδια *Ccnb1* και *Nefm* που υποεκφράστηκαν κατά 1,50 φορές σε σχέση με τα κύτταρα ελέγχου.

Πίνακας 7. Γονίδια που υπερεκφράστηκαν και υποεκφράστηκαν στις 15 ώρες επώασης με το εκχύλισμα στεμφύλων και διαφορά στην έκφρασή τους.

Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης
Actg2	1.85
Myl9	1.81
Acta2	1.76
Gpr176	1.75
Tmem45a	1.73
Mgp	1.67
Ogn	1.60
Crlf1	1.59
Nrep	1.58
Spon2	1.57
Aqp5	1.53
Thbs1	1.53
Nnmt	1.50
Prfl	-1.54
Sapcd2	-1.53
Ccnb1	-1.50
Nefm	-1.50

### 5.3.2. Διαφορές στην έκφραση αντιοξειδωτικών γονιδίων (Fold change analysis)

Στην προηγούμενη μελέτη εξετάστηκε η ικανότητα του εκχυλίσματος να επηρεάσει τα επίπεδα και τη δραστικότητα διαφόρων ενζύμων (Κεφάλαιο 4). Τα ένζυμα που μελετήθηκαν ήταν η GCS, η GST, η SOD, η CAT και η HO-1. Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης των παραπάνω γονιδίων παρατηρήθηκε ότι το γονίδιο της GCS υπερεκφράστηκε κατά 1,24 φορές ενώ πέντε ισομορφές της GST, οι *Gstk1*, *Gstp2*, *Gsta2*, *Gsta4* και *Gsta1* υπερεκφράστηκαν κατά 1,16, 1,15, 1,19, 1,17 και 1,17 φορές αντίστοιχα. Το γονίδιο της *Hmox-1* υπερεκφράστηκε κατά 1,26 φορές ενώ δεν

άλλαξε η έκφραση των γονιδίων της *Cat* και της *Sod*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8. Αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης σε αντιοξειδωτικά γονίδια.

Σύμβολο γονιδίου	Διαφορά έκφρασης
Gcs	1.25
Gstk1	1.16
Gstp2	1.16
Gsta2	1.19
Gsta4	1.17
Gsta1	1.17
Hmox1	1.26
Cat	1.00
Sod	1.00

#### 5.4. Συζήτηση

Τα αποτελέσματα των μελετών που προηγήθηκαν αποδεικνύουν την ικανότητα των εκχυλισμάτων σταφυλιών να ασκούν βιολογικές δράσεις στα μυϊκά κύτταρα C2C12. Συγκεκριμένα το εκχύλισμα στεμφύλων σταφυλιού της τοπικής ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου άσκησε αντιοξειδωτική δράση βελτιώνοντας τους δείκτες οξειδωτικού στρες των κυττάρων. Παράλληλα προστάτεψε τα κύτταρα που εκτέθηκαν στον παράγοντα tBHP από την οξειδωτική βλάβη. Η αντιοξειδωτική του δράση οφείλονταν κυρίως στην αύξηση των επιπέδων της ανηγμένης γλουταθειόνης. Παρατηρήθηκε ότι είχε την ικανότητα να αυξάνει τα επίπεδα της GCS ενός ενζύμου που καταλύει το πρώτο βήμα της βιοσύνθεσης της γλουταθειόνης, αλλά και να αυξάνει την δραστικότητα της GST ενός ενζύμου που χρησιμοποιεί την γλουταθειόνη και εμπλέκεται στην αποτοξίνωση των οργανικών εποξειδίων, υδροϋπεροξειδίων και

ακόρεστων αλδεϋδών που σχηματίζονται κυρίως μετά την υπεροξειδωση των λιπιδίων. Οι αλλαγές αυτές στα προαναφερθέντα ένζυμα πιθανόν να οφείλονται σε αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης των γονιδίων που τα κωδικοποιούν. Επίσης το εκχύλισμα δύναται να επηρεάζει την έκφραση και άλλων γονιδίων με διάφορους ρόλους στην ανάπτυξη και λειτουργία των κυττάρων. Αρκετές πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι διάφορες πολυφαινόλες είναι ικανές να επηρεάζουν την γονιδιακή έκφραση των μυϊκών κυττάρων C2C12 (Yoshino et al., 2015; Bosutti and Degens, 2015; Montesano et al., 2013; Kaminski et al., 2012).

Έτσι, σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να εξεταστεί η επίδραση του εκχυλίσματος στεμφύλων σταφυλιού από την ποικιλία Μπατίκι Τυρνάβου στη γονιδιακή έκφραση των κυττάρων C2C12 με τη χρήση DNA μικροσυστοιχιών για να διερευνηθούν οι μοριακοί μηχανισμοί μέσω των οποίων ασκείται η αντιοξειδωτική δράση στα συγκεκριμένα κύτταρα. Έτσι, εξετάστηκε η επίδραση στη γονιδιακή έκφραση των κυττάρων C2C12 μετά από επώαση με το εκχύλισμα για 16 ώρες. Αυτό έγινε γιατί παρατηρήθηκε από τα προηγούμενα πειράματα ότι από τις 12 ώρες επώασης και μετά το εκχύλισμα είχε την ικανότητα να επηρεάζει τα επίπεδα και την δραστικότητα αντιοξειδωτικών ενζύμων. Έτσι, εξετάστηκε κατά πόσο αλλάζει η γονιδιακή έκφραση στα κύτταρα C2C12 λόγω της επίδρασης του εκχυλίσματος καθώς και ποια γονίδια εμφανίζουν τις μεγαλύτερες αλλαγές.

Λαμβάνοντας ως όριο υπερέκφρασης και υποέκφρασης τις 1,5 φορές, στα μυϊκά κύτταρα C2C12 που επώαστηκαν για 15 ώρες με το εκχύλισμα στεμφύλων σταφυλιού υπερεκφράστηκαν 13 γονίδια και υποεκφράστηκαν 4 γονίδια σε σύγκριση με τα κύτταρα μάρτυρες.



Το γονίδιο *Actg2* εμφάνισε την μεγαλύτερη αύξηση κατά 1,85 φορές και κωδικοποιεί την ακτίνη *actg2* (Actin, gamma-enteric smooth muscle 2). Οι ακτίνες είναι άκρως συντηρημένες πρωτεΐνες που εμπλέκονται σε διάφορους τύπους κυτταρικής κινητικότητας, και στη συντήρηση του κυτταροσκελετού. Στα σπονδυλωτά, έχουν ταυτοποιηθεί τρεις κύριες ομάδες ισομορφών ακτίνης, η άλφα, η βήτα και η γάμμα. Οι ακτίνες άλφα έχουν εντοπιστεί σε μυϊκούς ιστούς και παίζουν σημαντικό ρόλο στη συστολής του μυός. Οι βήτα και γάμμα ακτίνες συνυπάρχουν στους περισσότερους τύπους κυττάρων ως συστατικά του κυτταροσκελετού, καθώς και ως μεσολαβητές της κινητικότητας στο εσωτερικό των κυττάρων. Η ακτίνη γάμμα-2, που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο, είναι μια ακτίνη των λείων μυών που βρίσκεται κυρίως στον εντερικό ιστό (GenBank).

Το γονίδιο με την δεύτερη μεγαλύτερη έκφραση κατά 1,81 φορές ήταν το *Myl9* (*Myl9 fold myosin, light polypeptide 9, regulatory*). Πρόκειται για ένα γονίδιο που κωδικοποιεί για μια ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης. Η μυοσίνη, είναι μια δομική πρωτεΐνη του μυός, αποτελείται από δύο βαριές αλυσίδες και τέσσερις ελαφριές αλυσίδες. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι μια ελαφριά αλυσίδα μυοσίνης που μπορεί να ρυθμίζει τη σύσπαση των μυών με ρύθμιση της δραστηριότητας ΑΤΡάσης των κεφαλών της μυοσίνης. Η κωδικοποιημένη πρωτεΐνη έχει μια περιοχή δέσμευσης ασβεστίου και ενεργοποιείται από την κινάση της ελαφράς αλυσίδας της μυοσίνης. Δύο εναλλακτικά μετάγραφα που κωδικοποιούν διαφορετικές ισομορφές έχουν βρεθεί για το γονίδιο αυτό (Szczesna-Cordary et al., 2005). Ιστοί που εμφανίζουν αυξημένη έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου είναι το εμβρυϊκό μεσέγχυμα, το πεπτικό, το καρδιαγγειακό, το νευρικό, το οσφρητικό, το

αναπαραγωγικό, το αναπνευστικό και το ουροποιητικού σύστημα. Επίσης αυξημένη έκφραση παρατηρήθηκε στο ήπαρ και στο χοληφόρο σύστημα (Ensembl).

Το τρίτο σε σειρά γονίδιο που υπερεκφράστηκε κατά 1,76 φορές ήταν το *Acta2*. Το συγκεκριμένο γονίδιο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των πρωτεϊνών ακτίνης, οι οποίες είναι άκρως συντηρημένες πρωτεΐνες που παίζουν ρόλο στην κυτταρική κινητικότητα, τη δομή και την ακεραιότητα. Αυτή η ακτίνη είναι μια άλφα ισομορφή ακτίνης που βρίσκεται στο σκελετικό μυ, στο καρδιαγγειακό σύστημα αλλά και στο μάτι. Ελαττωματικά αλληλόμορφα στο γονίδιο αυτό αποτελούν αιτία για θωρακικό αορτικό οικογενές ανεύρυσμα τύπου 6. Πολλαπλά εναλλακτικά μετάγραφα που κωδικοποιούν την ίδια πρωτεΐνη, έχουν ταυτοποιηθεί (Gene Cards).

Το γονίδιο *Gpr176* ήταν το τέταρτο σε σειρά υπερέκφρασης με μια αύξηση των 1,75 φορές στα κύτταρα που χορηγήθηκε το εκχύλισμα. Λίγα είναι γνωστά για το συγκεκριμένο γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη υποδοχέα τύπου GPCR (*G protein-coupled receptor 176*) (Gene Cards). Πιστεύεται ότι σχετίζεται με την απόκριση σε εξωκυτταρικά ερεθίσματα και στη σηματοδότηση. Εκφράζεται κυρίως στο ουροποιητικό σύστημα, καθώς επίσης στο εμβρυακό μεσέγχυμα και στο αναπαραγωγικό σύστημα σε μικρότερο βαθμό (Ensembl).

Το γονίδιο με την πέμπτη μεγαλύτερη έκφραση ήταν το *Tmem45a* (*transmembrane protein 45a fold change*). Αν και δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για το γονίδιο αυτό, πιστεύεται ότι κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη στον ποντικό. Οι ιστοί με την μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου αυτού είναι το εμβρυϊκό μεσέγχυμα, ιστοί των άκρων καθώς και του αναπαραγωγικού και ουροποιητικού συστήματος (Ensembl). Πιστεύεται ότι παίζει ρόλο στην κυτταρική διαφοροποίηση αλλά δρα σαν ογκογονίδιο και σχετίζεται με μορφές καρκίνου όπως το γλοίωμα και ο καρκίνος των ωοθηκών (Sun et al., 2015; Guo et al., 2015).

Την έκτη μεγαλύτερη υπερέκφραση παρουσίασε το γονίδιο *Mgp* (*matrix Gla protein*) κατά 1,67 φορές. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί η Matrix GLA (MGP) είναι μέλος της οικογένειας των εξαρτώμενων, από βιταμίνη Κ πρωτεϊνών που περιέχουν Gla επικράτεια. Η MGP περιέχει θέση σύνδεσης με ιόντα ασβεστίου, παρόμοια με άλλες Gla επικράτειες που περιέχουν πρωτεΐνες υψηλής συγγένειας για βιταμίνη Κ. Η πρωτεΐνη αυτή παίζει ρόλο στην οργάνωση των οστών (Yao et al., 2013; Luo et al., 1997). Η MGP βρίσκεται σε διάφορους ιστούς του σώματος θηλαστικών, πουλιών, και ψαριών. Το mRNA του είναι παρόν στο εμβρυϊκό μεσέγχυμα, στο πεπτικό σύστημα, στο ενδοκρινικό και εξωκρινικό σύστημα, στα οστά, στους χόνδρους, την καρδιά, τους νεφρούς, μυοσκελετικό και στο νευρικό σύστημα. (Pinto et al., 2013; Ensembl). Είναι παρούσα στον οστίτη ιστό μαζί με τη σχετική βιταμίνη Κ-εξαρτώμενη πρωτεΐνη, οστεοκαλσίνη. Στα οστά, η παραγωγή της αυξάνεται από τη βιταμίνη D. Ανωμαλίες στο γονίδιο *MGP* στον άνθρωπο έχουν συνδεθεί με το σύνδρομο Keutel, μια σπάνια κατάσταση που χαρακτηρίζεται από μη φυσιολογική εναπόθεση ασβεστίου στο χόνδρο, περιφερική στένωση της πνευμονικής αρτηρίας, και μεσοπροσωπικής υποπλασίας (Munroe et al., 1999). Ποντικοί που στερούνται

MGP αναπτύσσονται μέχρι ένα σημείο, αλλά πεθαίνουν μέσα σε δύο μήνες ως αποτέλεσμα της αρτηριακής εναπόθεσης ασβεστίου στις αρτηρίες που οδηγεί σε ρήξη των αιμοφόρων αγγείων (Luo et al., 1997).

Ακολουθεί το γονίδιο *Ogn* (*osteoglycin*) που αυξάνεται κατά 1,60 φορές και κωδικοποιεί την πρωτεΐνη οστεογλυκίνη. Το γονίδιο εκφράζει τρία εναλλακτικά μετάγραφα και έχει βρεθεί ότι εκφράζεται κυρίως στο εμβρυικό μεσέγχυμα, στο μυοσκελετικό σύστημα, στο νευρικό σύστημα, στο οσφρητικό σύστημα και στο αναπαραγωγικό σύστημα. Αυτή η πρωτεΐνη μπορεί να επάγει έκτοπο σχηματισμό οστού σε συνδυασμό με αυξητικό παράγοντα εξαλλαγής βήτα (TGFβ). Αυτή η πρωτεΐνη είναι μια μικρή πρωτεογλυκάνη η οποία περιέχει συνδυασμό πλούσιων σε λευκίνη επαναλήψεων (LRR). Το επίπεδο έκφρασης αυτού του γονιδίου έχει συσχετιστεί με διευρυμένη καρδιά και πιο συγκεκριμένα υπερτροφία της αριστερής κοιλίας (Petretto et al., 2008). Επίσης σχετίζεται με την κυτταρική διαφοροποίηση, την κυτταρική οργάνωση και στην συστηματική ανάπτυξη (Ensembl).

Το επόμενο γονίδιο που υπερεκφράστηκε κατά 1,59 φορές ήταν το *Crflf1* (*Cytokine receptor-like factor 1*) που κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που πιθανολογείται με βάση την δομή της ότι μπορεί να προσδεθεί σε υποδοχέα παρόμοιων υποδοχέων κυτοκινών. Μπορεί να σχετίζεται με τον κυτταρικό θάνατο, την κυτταρική διαφοροποίηση, την απόκριση σε ερεθίσματα και την σηματοδότηση (Ensembl). Η πρωτεΐνη εντοπίζεται κυρίως στον εξωκυττάριο χώρο και εκφράζεται στο εμβρυικό μεσέγχυμα, στο δέρμα, στο ήπαρ, χοληφόρο σύστημα, στο μυοσκελετικό, στο νευρικό, στο οσφρητικό, στο αναπαραγωγικό, στο αναπνευστικό, στο ουροποιητικό και στο πεπτικό σύστημα (Ensembl).

Το γονίδιο με την ένατη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 1,58 φορές ήταν το *Nrep* (*neuronal regeneration related protein*). Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται δεν είναι ιδιαίτερα μελετημένη. Μπορεί να έχει κάποιους ρόλους στη νευρική λειτουργία καθώς εκφράζεται κυρίως στο νευρικό, στο ακουστικό και στο οπτικό σύστημα (Ensembl). Η έκτοπη έκφραση αυξάνει την κινητικότητα των γλοιωμάτων. Προωθεί επίσης την αναγέννηση των νευραξόνων (με βάση την ομολογία του με άλλα γονίδια). Μπορεί επίσης να λειτουργεί στην κυτταρική διαφοροποίηση (με βάση την ομολογία του με άλλα γονίδια). Προκαλεί διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε μυοϊνοβλάστη και μυοϊνοβλαστική αμοιβαδοειδή μετανάστευση. Αυξάνει επίσης τη ρύθμιση ρετινοϊκού οξέος στην βιογένεση των λιπιδίων (με βάση την ομολογία του με άλλα γονίδια). Ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του TGFB1 και TGFB2 αλλά όχι του TGFB3 (με βάση την ομολογία του με άλλα γονίδια) (Gene Cards). Πιθανολογείται πως εντοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου.

Ακολουθεί το γονίδιο *Spon2* (*spondin 2, extracellular matrix protein*) που υπερεκφράζεται κατά 1,57 φορές. Λίγα είναι γνωστά για την λειτουργία της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί. Μεταξύ των μονοπατιών με τα οποία σχετίζεται είναι το μονοπάτι της ERK. Ένα σημαντικό ομόλογο αυτού του γονιδίου είναι το *THSD7A*. Πιθανόν αποτελεί πρωτεΐνη κυτταρικής πρόσφυσης που προάγει την πρόσφυση και την έκφυση των εμβρυϊκών νευρώνων του υποκάμπου (Gene Cards).

Το γονίδιο με την ενδέκατη μεγαλύτερη υπερέκφραση κατά 1,53 φορές ήταν το γονίδιο *Aqp5* (*aquaporin 5*) που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη ακουαπορίνη. Η ακουαπορίνη αποτελεί μια διαμεμβρανική πρωτεΐνη που ανήκει στην οικογένεια των πορινών, πρωτεϊνών με δράση μεταφορέα. Εντοπίζεται στην κυτταρική μεμβράνη αλλά και στην μεμβράνη του ενδοπλασματικού δικτύου. Ιστοί στους οποίους

εντοπίζεται μεγαλύτερη έκφραση της ακουαπορίνης είναι το πεπτικό, το οσφρητικό το αναπαραγωγικό και το αναπνευστικό σύστημα (Ensembl). In vivo πειράματα σε ποντικούς έδειξαν ότι η χορήγηση ρεσβερατρόλης αύξησε την έκφραση του γονιδίου *Aqp5*, ενώ παράλληλα μείωσε την λιπιδική υπεροξειδωση επιθηλιακών κυττάρων (Takahashi et al., 2015).

Παρόμοια αύξηση στην έκφραση με την *Aqp5* παρουσίασε και το γονίδιο *Thbs1* (*thrombospondin 1*). Η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό το γονίδιο είναι μία υπομονάδα μιας δισουλφιδίου-συνδεδεμένης ομοτριμερής πρωτεΐνης. Αυτή η πρωτεΐνη είναι μια γλυκοπρωτεΐνη συγκόλλησης που μεσολαβεί στις αλληλεπιδράσεις κυττάρου - κυττάρου. Αυτή η πρωτεΐνη μπορεί να συνδεθεί με ινωδογόνο, ινονεκτίνη, λαμινίνη, τύπου V κολλαγόνου και ιντεγκρίνες άλφα-ν / βήτα-1. Έχειδειχθεί ότι παίζει ρόλο στη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων, την αγγειογένεση, και την ογκογένεση. Εναλλακτικά μετάγραφα κωδικοποιούν διαφορετικές ισομορφές (GenBank). Η πρωτεΐνη θρομβοσπονδίνη-1 είναι ένα μέλος της οικογένειας θρομβοσπονδίνης. Είναι μια γλυκοπρωτεΐνη μήτρα πολυ-τομέα που έχειδειχθεί ότι είναι ένας φυσικός αναστολέας της νεοαγγείωσης και ογκογένεσης σε υγιή ιστό. Ρυθμίζει τόσο θετικά όσο και αρνητικά την διαφοροποίηση του ενδοθηλιακού κυττάρου, την κινητικότητα και την ανάπτυξη. (Simantov and Silverstein, 2003). Στην μυϊκή ατροφία το οξειδωτικό στρες παίζει σημαντικό ρόλο και η μείωσή του σχετίζεται με την βελτιωμένη λειτουργία των μυών. Σε μια μελέτη η χορήγηση ενός αντιοξειδωτικού μορίου, της ασταξανθίνης προκάλεσε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της *Thbs1* σε ατροφικούς υποκνημίδιους μύες αρουραίων. Επίσης, παράλληλα μείωσε το οξειδωτικό στρες και πιστεύεται ότι η *Thbs1* μπορεί να εμπλέκεται σε αυτόν το μηχανισμό (Kanazashi et al., 2013).

Τέλος το γονίδιο *Nnmt* (*nicotinamide N-methyltransferase*) υπερεκφράστηκε κατά 1,50 φορές. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί την πρωτεΐνη N-μεθυλοτρανσφεράση του νικοτιναμιδίου. Πρόκειται για μια τρανσφεράση που εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα κυττάρων διαφόρων ιστών και η αντίδραση που καταλύει είναι η μεταφορά μιας μεθυλομάδας από την S-αδενοσυλ-L-μεθειονίνη στο νικοτιναμίδιο. Πειράματα που έγιναν σε ποντικούς έδειξαν ότι παίζει κάποιον ρόλο στον μεταβολισμό. Τα ποντίκια που παρήγαγαν μεγάλες ποσότητες του GLUT4 ήταν ευαίσθητα στην ινσουλίνη και προστατεύονται κατά του διαβήτη, ενώ τα ποντίκια που δεν διέθεταν GLUT4 εμφάνισαν αντίσταση στην ινσουλίνη. Υψηλά επίπεδα του NNMT συχνά βρίσκονται στα λιπώδη κύτταρα των ζώων που εμφανίζουν αντίσταση στην ινσουλίνη. Όταν οι ερευνητές σίγησαν το γονίδιο του NNMT σε ποντίκια που λάμβαναν δίαιτα υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά, τα ποντίκια πήραν λιγότερο βάρος από εκείνους στους οποίους το γονίδιο NNMT λειτουργούσε κανονικά. Ωστόσο η έκφρασή του σε μυϊκούς ιστούς δεν έχει συσχετιστεί με κάποια ασθένεια (WikiGenes).

Από τα γονίδια που υποεκφράστηκαν το γονίδιο *Prf1* (*pore forming protein*) που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη περφορίνη είναι αυτό που ελαττώθηκε περισσότερο κατά 1,54 φορές. Η περφορίνη είναι πρωτεΐνη σχηματισμού πόρου με κυτταρολυτική δράση κυτταρολυτική που βρίσκεται στα κοκκία των κυτταρολυτικών T-λεμφοκυττάρων (CTLs) και των φονικών κυττάρων NK. Κατά την αποκοκκίωση, η περφορίνη συνδέεται με μεμβράνη του κυττάρου-στόχου, καθώς και η δράση της εξαρτάται από την συγκέντρωση των  $Ca^{2+}$ . Ο πόρος που σχηματίζεται επιτρέπει την παθητική διάχυση μιας οικογένειας προ-αποπτωτικών πρωτεασών, στο κύτταρο-

στόχο (Tarani, 1996). Όσον αφορά την έκφραση της σε μυϊκά κύτταρα δεν υπάρχουν πληροφορίες (Ensembl).

Το δεύτερο σε υποέκφραση γονίδιο ήταν το *Sapcd2* (*suppressor APC domain containing 2*) κατά 1,53 φορές. Κωδικοποιεί μια κυττοπλασματική αλλά πιθανόν και πυρηνική πρωτεΐνη που εμφανίζει αυξημένη έκφραση στο αδеноκαρκίνωμα του πνεύμονα, στο μη μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα, στο παγκρεατικό αδеноκαρκίνωμα και στο καρκίνωμα μεγάλων κυττάρων του πνεύμονα (Kim et al., 2015; Liu et al., 2014). Πιθανολογείτε ότι δρα σαν κατασταλτικός μεταγραφικός παράγοντας (με βάση την ομολογία). Αυξημένη έκφραση της πρωτεΐνης παρατηρείται στο εμβρυϊκό εξώδερμα, στο ήπαρ, στο νευρικό, στο πεπτικό, στο αναπαραγωγικό, αναπνευστικό και ουροποιητικό σύστημα. Όσον αφορά την έκφραση της σε μυϊκά κύτταρα δεν υπάρχουν πληροφορίες (Ensembl).

Δύο γονίδια παρουσίασαν την τρίτη μεγαλύτερη υποέκφραση κατά 1,50 φορές, το *Ccnb1* (*cyclin B1*) και το *Nefm* (*neurofilament, medium polypeptide*). Το γονίδιο *Ccnb1* κωδικοποιεί την κυκλίνη B1 (Cdk1). Η κυκλίνη B1 είναι μια ρυθμιστική πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην μίτωση. Το προϊόν του γονιδίου (Cdk1) δημιουργεί σύμπλοκα με την πρωτεΐνη p34 για να σχηματίσει τον παράγοντα ωρίμανσης και προαγωγής (MPF) (Yang et al., 2001; Pines and Hunter, 1989). Δύο εναλλακτικά μετάγραφα έχουν βρεθεί, ένα σταθερά εκφραζόμενο μετάγραφο και άλλο ένα που ρυθμίζεται από τον κυτταρικό κύκλο και εκφράζεται κυρίως κατά G2 / M φάση του κυτταρικού κύκλου. Το σύμπλοκο κυκλίνη B1-Cdk1 εμπλέκεται στα πρώιμα γεγονότα της μίτωσης, όπως η συμπύκνωση χρωμοσωμάτων και η διάλυση του πυρηνικού φακέλου. Υψηλά επίπεδα έκφρασης της κυκλίνης B1 έχουν παρατηρηθεί σε μορφές καρκίνου όπως του πνεύμονα και του μαστού (Suzuki et al.,



2007; Egloff et al., 2005; Soria et al., 2000). Εκφράζεται σε κύτταρα των περισσότερων ιστών συμπεριλαμβανομένου και του μυός. Σε φυσιολογικούς ιστούς, χαμηλά επίπεδα της κυκλίνης B1 ανιχνεύονται στους όρχεις, στο θύμο, στο μυελό των οστών, και των λείων μυών (έκφραση CCND1) (atlasgeneticsoncology.org). Η ελάττωση της έκφρασής του στα κύτταρα σχετίζεται με αναστολή της κυτταρικής διαίρεσης και πιθανόν προωθεί την διαφοροποίησή τους. Η χορήγηση γαλλικού οξέος σε λεία μυϊκά αγγειακά κύτταρα οδήγησε σε μείωση της έκφρασης της κυκλίνης B1. Παράλληλα φάνηκε ότι η χορήγηση του γαλλικού οξέος απέτρεπε την εμφάνιση αθηροσκλήρωσης (Ou et al., 2013).

Το γονίδιο *Nefm* (*neurofilament, medium polypeptide*) κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη νευρονηματίου. Τα νευρονημάτια αυτά είναι τύπου IV και δημιουργούν ετεροπολυμερή ενδιάμεσων νηματίων που αποτελούνται από ελαφριές (του NEF), μεσαίες (αυτής της πρωτεΐνης), και βαριές (NEFH) αλυσίδες. Τα νευρονημάτια περιλαμβάνουν τον σκελετό του άξονα των νευρικών κυττάρων και λειτουργικά διατηρεί το διαμέτρημα του νευρώνα. Μπορούν επίσης να παίζει ένα ρόλο στην ενδοκυτταρική μεταφορά προς άξονες και δενδρίτες. Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί την πρωτεΐνη της μεσαίας αλυσίδας νευρονηματίων. Αυτή η πρωτεΐνη χρησιμοποιείται συνήθως ως βιοδείκτης της νευρωνικής βλάβης (GenBank). Διάφορα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου έχουν βρεθεί στους περισσότερους ιστούς.

Όσον αφορά την μελέτη της έκφρασης αντιοξειδωτικών γονιδίων εξετάστηκε η έκφραση των γονιδίων *Gcs*, *Gst*, *Sod*, *Cat* και *Hmox1*. Όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης των παραπάνω γονιδίων παρατηρήθηκε ότι το γονίδιο της GCS υπερεκφράστηκε κατά 1,24 φορές. Στο 'Κεφάλαιο 3' της παρούσας διατριβής δείχθηκε ότι το εκχύλισμα στεμφύλων σταφυλιού αύξησε τα επίπεδα του ενζύμου

GSC. Άρα πιθανόν αυτή η αύξηση να οφείλεται στην αύξηση της γονιδιακής έκφρασης του γονιδίου *Gcs* έπειτα από την χορήγηση του εκχυλίσματος. Πέντε γονίδια των ισομορφών της GST, τα *Gstk1*, *Gstp2*, *Gsta2*, *Gsta4* και *Gsta1* υπερεκφράστηκαν κατά 1,16, 1,15, 1,19, 1,17 και 1,17 φορές αντίστοιχα. Τα προηγούμενα αποτελέσματα (Κεφάλαιο 3) έδειξαν ότι το εκχύλισμα αύξησε την δραστικότητα της ολικής GST των μυϊκών κυττάρων. Η αύξηση της δραστικότητας πιθανόν να οφείλεται σε αύξηση των επιπέδων των διαφόρων ισομορφών της GST. Το γονίδιο *Hmox1* υπερεκφράστηκε κατά 1,26 φορές, ωστόσο τα επίπεδα του ενζύμου δεν επηρεάστηκαν από την χορήγηση του εκχυλίσματος. Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε μεταμεταγραφικό έλεγχο του γονιδίου. Η χορήγηση του εκχυλίσματος δεν άλλαξε η έκφραση των γονιδίων της CAT και της SOD. Στο κεφάλαιο 3 παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα και η δραστικότητα της SOD δεν άλλαξαν έπειτα από τη χορήγηση του εκχυλίσματος. Αντίθετα παρατηρήθηκε μια μείωση των επιπέδων και της δραστικότητας της CAT. Αυτό πιθανόν να οφείλεται σε μετα-μεταγραφικές ή μεταφραστικές τροποποιήσεις της CAT.

Τα μυϊκά κύτταρα της σειράς C2C12 αποτελούν μυοβλάστες ποντικού. Τα κύτταρα αυτά παρατηρήθηκαν αρχικά από τους Yaffe και Saxel (1977) μέσω ενός μονοπατιού των μυοβλαστών τα οποία καλλιεργήθηκαν από πλατύ μηριαίου μυ ποντικού μετά από μηχανικό τραυματισμό. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν την ικανότητα του εκχυλίσματος στεμφύλων να ενισχύουν την αντιοξειδωτική άμυνα των μυϊκών κυττάρων C2C12 επηρεάζοντας την μεταγραφή αντιοξειδωτικών γονιδίων. Συγκεκριμένα παρατηρήθηκε αύξηση του mRNA του γονιδίου *Gcs* και μιας σειράς ισομορφών της *Gst*. Το γεγονός αυτό έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της προηγούμενης μελέτης όπου παρατηρήθηκε

αύξηση των επιπέδων της πρωτεΐνης GCS και της δραστηριότητας της GST (Κεφάλαιο 3). Η αύξηση των επιπέδων των mRNA αυτών των γονιδίων πιθανόν να προκάλεσε την αύξηση των επιπέδων και κατ' επέκταση της δραστηριότητάς τους. Επίσης παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασης της HO-1 ωστόσο δεν παρατηρήθηκε αύξηση της HO-1 σε πρωτεϊνικό επίπεδο πιθανό λόγω μετα-μεταφραστικού ελέγχου της έκφρασής της. Όσον αφορά τα γονίδια με την μεγαλύτερη αλλαγή στην έκφραση παρατηρήθηκε μια αύξηση της έκφρασης της Aqr5. Παρόμοια αύξηση της έκφρασής της παρατηρήθηκε σε κύτταρα ποντικών που χορηγήθηκε η ρεσβερατρόλη, ένα αντιοξειδωτικό που βρίσκεται κυρίως στα σταφύλια και τα προϊόντα τους (Takahashi et al., 2015). Πιθανόν το προϊόν του γονιδίου αυτού να παίζει κάποιο ρόλο στους μηχανισμούς μέσω των οποίων, αντιοξειδωτικά μόρια από σταφύλια μπορούν να προκαλέσουν αντιοξειδωτική δράση. Το γονίδιο *Thbs1* που υπερεκφράστηκε στη συγκεκριμένη μελέτη αυξήθηκε με παρόμοιο τρόπο σε μυϊκά κύτταρα αρουραίων έπειτα από χορήγηση ασταξανθίνης. Η ασταξανθίνη αποτελεί ισχυρό αντιοξειδωτικό και ασκεί προστατευτική δράση σε ατροφικά μυϊκά κύτταρα μέσω μείωσης του οξειδωτικού στρες (Kanazashi et al., 2013). Ίσως το γονίδιο *Thbs1* αποτελεί τμήμα των μηχανισμών μέσω των οποίων τα αντιοξειδωτικά ασκούν αντιοξειδωτική δράση. Η μείωση της έκφρασης της κυκλίνης B1 που παρατηρήθηκε, έχει επίσης παρατηρηθεί έπειτα από χορήγηση γαλλικού οξέος σε λεία μυϊκά αγγειακά κύτταρα (Ou et al., 2013). Το γαλλικό οξύ είναι άλλη μια πολυφαινόλη που βρίσκεται στο σταφύλι και τα προϊόντα του. Έχει συσχετιστεί κυρίως με την διαφοροποίηση των κυττάρων αλλά και την μη προώθηση του κυτταρικού κύκλου.

Συμπερασματικά, τα αποτελέσματα από την παρούσα μελέτη ήταν πολύ ενδιαφέροντα όσον αφορά την επίδραση του εκχύλισματος στεμφύλων σταφυλιού της

ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου στην γονιδιακή έκφραση των μυοβλαστών C2C12 που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική άμυνα αυτών των κυττάρων. Επίσης πρέπει να γίνουν επιπλέον μελέτες για να διερευνηθεί αναλυτικότερα ο ρόλος της αλλαγής της έκφρασης αυτών των γονιδίων σε διάφορες χρονικές περιόδους χορήγησης διαφόρων συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος. Κάπι τέτοιο θα μας έδινε περισσότερες πληροφορίες για τους μηχανισμούς με τους οποίους το εκχύλισμα ασκεί την δράση του.

## Συμπεράσματα – προοπτικές

Η διατριβή αυτή είχε ως στόχο την απάντηση ορισμένων βασικών ερωτημάτων σχετικών με την έρευνα στον τομέα του οξειδωτικού στρες και των αντιοξειδωτικών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι εκχύλισμα στεμφύλων και βοστρύχων σταφυλιού πλούσια σε πολυφαινόλες με ισχυρή *in vitro* δράση μπορούσαν να βελτιώσουν την οξειδοαναγωγικό κατάσταση μυϊκών και ενδοθηλιακών κυττάρων. Το εκχύλισμα στεμφύλων σταφυλιού της τοπικής ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου παρουσίασε την ισχυρότερη δράση, καθώς μείωσε τα επίπεδα των πρωτεϊνικών καρβονυλίων και αύξησε τα επίπεδα την GSH και στις δύο κυτταρικές σειρές. Επιπλέον στα μυϊκά κύτταρα μείωσε τα TBARS και τις ROS. Μάλιστα αυτή η δράση επιτεύχθηκε με την χρήση αρκετά μικρών συγκεντρώσεων. Παράλληλα ήταν ικανό να προστατεύσει τα κύτταρα από την οξειδωτική δράση το t-BHP. Η μελέτη των επιπέδων και της δραστηριότητας αντιοξειδωτικών γονιδίων στα κύτταρα έδειξε ότι το παραπάνω εκχύλισμα ήταν ικανό να δράσει στους ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς των κυττάρων. Η δραστηριότητα της GST αλλά και τα επίπεδα της GCS αυξήθηκαν σημαντικά στα μυϊκά και στα ενδοθηλιακά κύτταρα. Τα ένζυμα αυτά εμπλέκονται στον μεταβολισμό και την λειτουργία της GSH. Παρατηρείται μια γενική ενίσχυση του αντιοξειδωτικού συστήματος της GSH. Όσον αφορά την διαφορετική αντιοξειδωτική δράση εκχυλισμάτων βοστρύχων σταφυλιού στα μυϊκά και ενδοθηλιακά κύτταρα τα αποτελέσματα καταλήγουν στο συμπέρασμα πως η ποιοτική σύστασή τους σε πολυφαινόλες παίζει καθοριστικό ρόλο για την δράση τους. Τέλος αποδείχθηκε ότι το εκχύλισμα στεμφύλων σταφυλιού της τοπικής ποικιλίας Μπατίκι Τυρνάβου που ήταν ικανό να αλλάξει την γονιδιακή έκφραση των

μυϊκών κυττάρων. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι γονίδια που σχετίζονται με την αντιοξειδωτική άμυνα των κυττάρων υπερεκφράστηκαν.

Η διερεύνηση των αντιοξειδωτικών μηχανισμών δράσης εκχυλισμάτων αποτελεί μια πρόκληση με τελικό σκοπό την σωστή χρήση τους σαν συμπληρώματα διατροφής αλλά και ως συστατικά βιολειτουργικών τροφίμων προοριζόμενα για ειδικές πληθυσμιακές ομάδες. Επίσης ένα ακόμα ενδιαφέρον κομμάτι που αξίζει να μελετηθεί σε βάθος είναι οι επιδράσεις των πολυφαινολικών εκχυλισμάτων στην γονιδιακή έκφραση σε διάφορες κυτταρικές σειρές. Αυτό θα έδινε αρκετές πληροφορίες για τους μοριακούς μηχανισμούς δράσεις τους σε διάφορους ιστούς.

## Βιβλιογραφία

- Adlercreutz H, Mazur W (1997). Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med.* 29, 95-120.
- Aebi H (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105, 121-126.
- Alam J, Stewart D, Touchard C, Boinapally S, Choi AM, Cook JL (1999). Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. *J Biol Chem.* 274(37), 26071-26078.
- Alessio HM, Hagerman AE, Nagy S, Philip B, Byrnes RN, Woodward JL, Callahan P, Wiley RL (2005). Exercise improves biomarkers of health and stress in animals fed ad libitum. *Physiol Behav* 84(1), 65-72.
- Alia M, Ramos S, Mateos R, Bravo L, Goya L (2005). Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 19, 119-127.
- Alov P, Tsakovska I, Pajeva I (2015). Computational studies of free radical-scavenging properties of phenolic compounds. *Curr Top Med Chem* 15, 85-104.
- Ames BN (1986). Food constituents as a source of mutagens, carcinogens and anticarcinogens. *Prog Clin Biol Res* 206, 3-32.
- Anastasiadi M, Chorianopoulos NG, Nychas GJ, Haroutounian SA (2009). Antilisterial activities of polyphenol-rich extracts of grapes and vinification byproducts. *J Agric Food Chem* 57, 457-463.
- Antunes F, Han D, Cadenas E (2002). Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification in in vivo conditions. *Free Radic Biol Med.* 33(9), 1260-1267.

- Apostolou A, Stagos D, Galitsiou E, Spyrou A, Haroutounian S, Portesis N, Trizoglou I, Wallace Hayes A, Tsatsakis AM, Kouretas D (2013). Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. *Food Chem Toxicol* 61, 60-68.
- Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR (2014) Glutathione: New roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol* 5, 196.
- Arnao MB, Cano A, Alcolea JF, Acosta M (2001). Estimation of free radical-quenching activity of leaf pigment extracts. *Phytochem Anal* 12, 138-143.
- Backos DS, Fritz KS, McArthur DG, Kepa JK, Donson AM, Petersen DR, Foreman NK, Franklin CC, Reigan P (2013). Glycation of glutamate cysteine ligase by 2-deoxy-d-ribose and its potential impact on chemoresistance in glioblastoma. *Neurochem Res.* (9), 1838-1849
- Baczkó I, Light PE (2015). Resveratrol and derivatives for the treatment of atrial fibrillation. *Ann N Y Acad Sci.* 1348(1), 68-74.
- Badavi M, Abedi HA, Sarkaki AR, Dianat M (2013). Co-administration of grape seed extract and exercise training improves endothelial dysfunction of coronary vascular bed of STZ-induced diabetic rats. *Iran Red Crescent Med J* 15, e7624.
- Bagchi D, Sen CK, Ray SD, Das DK, Bagchi M, Preuss HG, Vinson JA (2003). Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutation Res* 523–524, 87-97.
- Bagchi D, Swaroop A, Preuss HG, Bagchi M (2014). Free radical scavenging, antioxidant and cancer chemoprevention by grape seed proanthocyanidin: An overview. *Mutat Res* 768, 69-73.



- Bak MJ, Jun M, Jeong WS (2012). Procyanidins from wild grape (*Vitis amurens*) seeds regulate ARE-mediated enzyme expression via Nrf2 coupled with p38 and PI3K/Akt pathway in HepG2 cells. *Int J Mol Sci* 13, 801-818.
- Baudet M, Daugareil C, Ferrieres J (2012). Cardiovascular disease prevention and life style modifications. *Ann Cardiol Angeiol* 61(2), 93–98.
- Baydar NG, Sagdic O, Ozkan G, Cetin S (2006). Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Int. J. Food Sci.* 41, 799–804.
- Beckman JS and Koppenol WH (1996). Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol.* 271(5 Pt 1), C1424-37.
- Bertelli A, Bertelli AAE, Gozzini A, Giovannini L (1998). Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp Clin Res.* 24, 133–138.
- Bettters JL, Criswell DS, Shanely RA, Van Gammeren D, Falk D, Deruisseau KC, Deering M, Yimlamai T, Powers SK (2004). Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am J Respir Crit Care Med.* 170(11), 1179-1184.
- Bielski BHJ and Cabelli DE (1995). Superoxide and hydroxyl radical chemistry in aqueous solution. In: *Active Oxygen in Chemistry*.
- Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot.* 91, 179-94.
- Bosutti A, Degens H (2015). The impact of resveratrol and hydrogen peroxide on muscle cell plasticity shows a dose-dependent interaction. *Sci Rep.* 28;5, 8093.

- Bradford MM (1976). A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-Dye Binding. *Anal Biochem* 72, 248–254.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol* 28, 25-30.
- Breimer LH (1990). Molecular mechanisms of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Mol Carcinog* 3(4), 188-97, Review.
- Cadenas E (1997). Basic mechanisms of antioxidant activity. *Biofactors* (4), 391-397.
- Cano A, Hernández-Ruiz J, García-Cánovas F, Acosta M (1998). An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem Anal* 9, 196-202.
- Carrizzo A, Forte M, Damato A, Trimarco V, Salzano F, Bartolo M, Maciag A, Puca AA, Vecchione C (2013). Antioxidant effects of resveratrol in cardiovascular, cerebral and metabolic diseases. *Food Chem Toxicol.* 61, 215-226.
- Chacon, M.R., Ceperuelo-Mallafre V, Maymó-Masip E, Mateo-Sanz JM, Arola L, Guitierrez C, Fernandez-Real JM, Ardèvol A, Simón I, Vendrell J (2009). Grape-seed procyanidins modulate inflammation on human differentiated adipocytes in vitro. *Cytokine* 47(2), 137–142.
- Chance B, Sies H, Boveris A (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59, 527-605.
- Chanda S and Dave R (2009). In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *Afr J Microbiol Res* 3, 981-996.

- Chao CL, Chang NC, Weng CS, Lee KR, Kao ST, Hsu JC, Ho FM (2011). Grape seed extract ameliorates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced inflammatory status of human umbilical vein endothelial cells. *Eur J Nutr* 6, 401–419.
- Cheeseman KH, Slater TF (1993). “An introduction to free radical biochemistry” Ends free radicals in medicine. *British Medical bulletin* 49, 481-493.
- Chen Q, Zhang R, Li WM, Niu YJ, Guo HC, Liu XH, Hou YC, Zhao LJ (2013). The protective effect of grape seed procyanidin extract against cadmium-induced renal oxidative damage in mice. *Environ Toxicol Pharmacol* 36: 759-768.
- Chen S, Zhu Y, Liu Z, Gao Z, Li B, Zhang D, Zhang Z, Jiang X, Liu Z, Meng L, Yang Y, Shi B (2015). Grape Seed Proanthocyanidin Extract Ameliorates Diabetic Bladder Dysfunction via the Activation of the Nrf2 Pathway. *PLoS One*. 2015 10(5), e0126457.
- Cheng C, Wang X, Weakley SM, Kougias P, Lin PH, Yao Q, Chen C (2010). The soybean isoflavonoid equol blocks ritonavir-induced endothelial dysfunction in porcine pulmonary arteries and human pulmonary artery endothelial cells. *J Nutr*. 140(1), 12-17
- Chidambara Murthy KN, Singh RP, Jayaprakasha GK (2002). Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. *J Agric Food Chem* 50, 5909-5914.
- Choi AM, Alam J (1996). Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 15(1), 9-19.
- Choi CS, Chung HK, Choi MK, Kang MH (2010). Effects of grape pomace on the antioxidant defense system in diet-induced hypercholesterolemic rabbits. *Nutr Res Pract* 4: 114-120.

- Chun JN, Cho M, So I, Jeon JH (2014). The protective effects of *Schisandra chinensis* fruit extract and its lignans against cardiovascular disease: a review of the molecular mechanisms. *Fitoterapia*. 97, 224-33
- Dalton TP, Chen Y, Schneider SN, Nebert DW, Shertzer HG (2004). Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radic Biol Med*. 37(10), 1511-1526.
- De Flora S, Ramel C (1990). Classification of mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Basic Life Sci*. 52, 461-462.
- Deanfield JE, Halcox JP, Rabelink TJ (2007). Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. *Circulation* 115, 1285-1295.
- Di Meo S and Venditti P (2001). Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 10, 125-140.
- Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF Jr (1997). Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* 337, 408-416.
- Ding Y, Dai X, Jiang Y, Zhang Z, Bao L, Li Y, Zhang F, Ma X, Cai X, Jing L (2013). Grape seed proanthocyanidin extracts alleviate oxidative stress and ER stress in skeletal muscle of low-dose streptozotocin- and high carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats. *Mol Nutr Food Res* 57, 365-369.
- Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H (2002). Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 32: 1102-1115.
- Douglas KT (1987). Mechanism of action of glutathione-dependent enzymes. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 59, 103-167.
- Downey JM (1990). Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia-reperfusion. *Annu Rev Physiol* 52, 487-504.

- Dupré-Croche S and Erard Mand Nüsse O (2013). ROS production in phagocytes: Why, when, and where? *J Leukoc Biol* 94, 657-670.
- Duthie GG, Gardner PT, Kyle JA (2003). Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proc Nutr Soc.* 62(3), 599-603.
- Egloff AM, Weissfeld J, Land SR, Finn OJ (2005). "Evaluation of anticyclin B1 serum antibody as a diagnostic and prognostic biomarker for lung cancer". *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1062, 29–40.
- Elsayed NM, Omaye ST, Klain GJ, Korte DW Jr (1992). Free radical-mediated lung response to the monofunctional sulfur mustard butyl 2-chloroethyl sulfide after subcutaneous injection. *Toxicology* 72, 153-165.
- Fang YZ, Yang S, Wu G (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition.* (10), 872-879. Review.
- Felice F, Zambito Y, Di Colo G, D'Onofrio C, Fausto C, Balbarini A, Di Stefano R (2012). Red grape skin and seeds polyphenols: Evidence of their protective effects on endothelial progenitor cells and improvement of their intestinal absorption. *Eur J Pharm Biopharm* 80(1), 176–184.
- Feng Z, Wei RB, Hong Q, Cui SY, Chen XM (2010). Grape seed extract enhances eNOS expression and NO production through regulating calcium-mediated AKT phosphorylation in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated endothelium. *Cell Biol Int* 34(10), 1055–1061.
- Ferguson LR (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat Res.* 475(1-2), 89-111.
- Feringa HH, Laskey DA, Dickson JE, Coleman CI (2011). The effect of grape seed extract on cardiovascular risk markers: A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Diet Assoc* 111, 1173-1181.

- Fernández-Iglesias A, Quesada H, Díaz S, Pajuelo D, Bladé C, Arola L, Salvadó MJ, Mulero M (2014). Combination of grape seed proanthocyanidin extract and docosahexaenoic acid-rich oil increases the hepatic detoxification by GST mediated GSH conjugation in a lipidic postprandial state. *Food Chem* 165, 14-20.
- Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D (1997). Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett* 416, 123–129.
- Filip A, Daicoviciu D, Clichici S, Bolfa P, Catoi C, Baldea I, Bolojan L, Olteanu D, Muresan A, Postescu ID (2011). The effects of grape seeds polyphenols on SKH-1 mice skin irradiated with multiple doses of UV-B. *J Photochem Photobiol B* 105, 133-142.
- Finaud J, Lac G, Filaire E (2006). Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med.* 36(4), 327-358.
- Flamini R, Mattivi F, De Rosso M, Arapitsas P, Bavaresco L (2013). Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: anthocyanins, stilbenes and flavonols. *Int J Mol Sci.* 14(10), 19651-19669
- Forman HJ and Torres M (2002). Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med.* 166, 4-8.
- Franklin CC, Backos DS, Mohar I, White CC, Forman HJ, Kavanagh TJ (2009). Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol Aspects Med.* (1-2), 86-98.

- Fridovich I (2011). Superoxide dismutases: Anti-versus pro-oxidants? *Anticancer Agents Med Chem* 11, 175-177.
- Gazzani G, Daglia M, Papetti A (2012). Food components with anticaries activity. *Curr Opin Biotechnol.* 23(2), 153-159.
- Georgakouli K, Fatouros IG, Kouretas D, Koutedakis Y, Jamurtas AZ (2013).  $\alpha$ -Lipoic acid supplementation up regulates antioxidant capacity in adults with G6PD deficiency. *Food Chem Toxicol* 61, 69–73.
- Giles GI and Jacob C (2002). Reactive sulfur species: an emerging concept in oxidative stress. *Biol Chem* 383, 375-388.
- Gomez-Cabrera MC, Borra's C, Pallardó FV, Sastre J, Ji LL, Viña J (2005). Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol* 567. 113–120.
- Green HJ, Fraser IG (1988). Differential effects of exercise intensity on serum uric acid concentration. *Med Sci Sports Exerc.* 20(1), 55-59.
- Griffith OW, Meister A (1979). Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem.* 1979 254(16), 7558-7560.
- Grune T, Reinhecker T, Davies KJA (1997). Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEBJ* 11, 526-534.
- Guo J, Chen L, Luo N, Yang W, Qu X, Cheng Z (2015). Inhibition of TMEM45A suppresses proliferation, induces cell cycle arrest and reduces cell invasion in human ovarian cancer cells. *Oncol Rep* 33(6), 3124-30.
- Guo R, Li W, Liu B, Li S, Zhang B, Xu Y (2014). Resveratrol protects vascular smooth muscle cells against high glucose-induced oxidative stress and cell proliferation in vitro. *Med Sci Monit Basic Res* 20, 82-92.

- Gutteridge JM, Halliwell B (1989). Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol* 2(2), 195-256.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.
- Halliwell B (1995). How to characterize an antioxidant: an update. *Biochem Soc Symp.* 61, 73-101.
- Halliwell B (2001). Free radicals and other reactive species in disease. In: *Nature Encyclopaedia of Life Sciences*. J. Wiley and Sons (eds). Nature Publishing Group, New York.
- Halliwell B (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys.* 476(2), 107-112.
- Halliwell B and Gutteridge JM (1999). *Free Radicals in Biology and Medicine*, third edition. Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England.
- Halliwell B and Gutteridge JMC (1989). *Free radicals in biology and medicine* (2nd ed.) Oxford, Clarendon Press, pp 136-158.
- Halliwell B and Gutteridge JMC (1990). "The antioxidants of human extracellular fluids". *Archives of Biochemistry and Biophysics* 280: 1-8.
- Halliwell B, Cross CE (1994). Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Perspect.* 102 Suppl 10, 5-12.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186, 1-85, Review.



- Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med* 16, 845–850.
- Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V (1997). Dependence of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr.* 29(1), 89-95.
- Hayes JD, McLellan LI (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* 31, 273–300.
- Hazel T, Muller T (2001). Culture of neuroepithelial stem cells. *Curr Protoc Neurosci.* Chapter 3:Unit 3.1. AQ2
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure–activity relationships. *J Nutr Biochem* 13, 572–584.
- Helbock HJ, Beckman KB, Ames BN (1999). 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol* 300, 156-166.
- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y (2009). Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73, 411-418.
- Hirano R, Sasamoto W, Matsumoto A, Itakura H, Igarashi O, Kondo K (2001). Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 47, 357–362.
- Hix S, Kadisiska MB, Mason RP, Augusto O (2000). In vivo metabolism of tert-butyl hydroperoxide to methyl radicals. EPR spin-trapping and DNA methylation studies. *Chem. Res. Toxicol.* 13, 1056-1064.

- Hosu A, Cristea VM, and Cimpoiu C (2013). Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. *Food Chem* 150, 113–118.
- Howes MJ, Simmonds MS (2014). The role of phytochemicals as micronutrients in health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*.17(6), 558-566.
- Hribar U, Ulrich NP (2014). The metabolism of anthocyanins. *Curr Drug Metab* 15(1), 3–13.
- Huang HL, Lin CC, Jeng KC, Yao PW, Chuang LT, Kuo SL, Hou CW (2012). Fresh green tea and gallic acid ameliorate oxidative stress in kainic acid-induced status epilepticus. *J Agric Food Chem* 60(9), 2328–2336.
- Jackson RS (1993). Chemical constituents of grapes and wine. In *Wine Science: Principles and applications*. Taylor SL ed. Academic Press.
- Jang, M. Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM. (1997). Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* (New York, N.Y.), 275, 218–220.
- Janiques AG, Leal VO, Stockler-Pinto MB, Moreira NX, Mafra D (2014). Effects of grape powder supplementation on inflammatory and antioxidant markers in hemodialysis patients: A randomized double-blind study. *J Bras Nefrol* 36, 496-501.
- Jansen T, Daiber A (2012). Direct Antioxidant Properties of Bilirubin and Biliverdin. Is there a Role for Biliverdin Reductase? *Front Pharmacol*. 3:30, eCollection.
- Jenkins RR (1988). Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med* 5(3), 156-170.

- Jeong WS, Jun M and Kong AN (2006). Nrf2: A potential molecular target for cancer chemoprevention by natural compounds. *Antioxid Redox Signal* 8, 99-106.
- Ji LL (2007). Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Exp Gerontol* 42, 582–593.
- Ji LL, Gomez-Cabrera MC, Vina J (2006). Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann NY Acad Sci* 1067, 425-435.
- Jimenez R, Lopez-Sepulveda R, Romero M, Toral M, Cogolludo A, Perez-Vizcaino F, Duarte J (2015). Quercetin and its metabolites inhibit the membrane NADPH oxidase activity in vascular smooth muscle cells from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Food Funct* 6, 409-414.
- Jones DP, Carlson JL, Mody VC, Cai J, Lynn MJ, Sternberg P (2000). Redox state of glutathione in human plasma. *Free Radic Biol Med* 28, 625-635.
- Jung HJ Hwang IA, Sung WS, Kang H, Kang BS, Seu YB, Lee DG (2005). Fungicidal effect of resveratrol on human infectious fungi. *Archives of pharmacal research*, 28(5), 557–560.
- Kahkonen MP and Heinonen M (2003). Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J Agric Food Chem* 51, 628–633.
- Kaminski J, Lançon A, Aires V, Limagne E, Tili E, Michaille JJ, Latruffe N (2012). Resveratrol initiates differentiation of mouse skeletal muscle-derived C2C12 myoblasts. *Biochem Pharmacol*. 84(10), 1251-9.
- Kanazashi M, Okumura Y, Al-Nassan S, Murakami S, Kondo H, Nagatomo F, Fujita N, Ishihara A, Roy RR, Fujino H (2013). Protective effects of astaxanthin on capillary regression in atrophied soleus muscle of rats. *Acta Physiol (Oxf)*, 207(2): 405-15.

- Kanner J and Lapidot T (2001). The stomach as a bioreactor: Dietary lipid peroxidation in the gastric fluid and the effects of plant-derived antioxidants. *Free Radic Biol Med* 31, 1388-1395.
- Kantsadi AL, Apostolou A, Theofanous S, Stravodimos GA, Kyriakis E, Gorgogietas VA, Chatzileontiadou DS, Pegiou K, Skamnaki VT, Stagos D Kouretas D, Psarra AM, Haroutounian SA, Leonidas DD (2014). Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* extracts against glycogen phosphorylase. *Food Chem Toxicol* 67, 35-43.
- Kar P, Laight D, Rooprai HK, Shaw KM, Cummings M (2009). Effects of grape seed extract in type 2 diabetic subjects at high cardiovascular risk: a double blind randomized placebo controlled trial examining metabolic markers, vascular tone, inflammation, oxidative stress and insulin sensitivity. *Diabet Med* 26(5), 526–531.
- Karpinska A and Gromadzka G (2013). Oxidative stress and natural antioxidant mechanisms: the role in neurodegeneration. From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Postepy Hig Med Dosw* 67, 43–53.
- Karvela E, Makris DP, Kalogeropoulos N, Karathanos VT (2009). Deployment of response surface methodology to optimise recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem polyphenols. *Talanta* 79, 1311-1321.
- Kaur M, Agarwal C, Agarwal R (2009). Anticancer and cancer chemopreventive potential of grape seed extract and other grape-based products. *The Journal of nutrition*, 139(9), 1806–1812.

- Keevil, J.G. Osman HE, Reed JD, Folts JD (2000). Grape juice, but not orange juice or grapefruit juice, inhibits human platelet aggregation. *The Journal of nutrition*, 130(1), 53–56.
- Keles MS, Taysi S, Sen N, Aksoy H, Akçay F (2001). Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 28, 141-143.
- Kelly VP, Ellis EM, Manson MM, Chanasm SA, Moffat GJ, McLeord R, Judah DJ, Neal GE, Hayes JD (2000). Chemopreventionmof aflatoxin B1 hepatocarcinogenesis by coumarinma natural benzopyrone that is a potentminducer of aflatoxin B1-aldehyde reductase, the glutathione S-transferase A5 and P1 subunits, and NAD(P)H:quinone oxidoreductase in rat liver. *Cancer Res.* 60, 957–969.
- Kelsen SG (2012). Respiratory epithelial cell responses to cigarette smoke: the unfolded protein response. *Pulm Pharmacol Ther* 25(6), 447–452.
- Kerasioti E, Kiskini A, Veskoukis A, Jamurtas A, Tsitsimpikou C, Tsatsakis AM, Koutedakis Y, Stagos D, Kouretas D and Karathanos V (2012). Effect of a special carbohydrate-protein cake on oxidative stress markers after exhaustive cycling in humans. *Food Chem Toxicol* 50, 2805-2810.
- Kerasioti E, Stagos D, Priftis A, Aivazidis S, Tsatsakis AM, Hayes AW, Kouretas D (2014). Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells. *Food Chem* 155, 271-278.
- Kim Y, Lee J, Choi YJ, Seo J, Park J, Lee SY, Cho JY (2015) .Proteogenomic Study beyond Chromosome 9: New Insight into Expressed Variant Proteome and Transcriptome in Human Lung Adenocarcinoma Tissues. *Journal of proteome research*, 14(12), 5007-16 .

- Kimura S, Warabi E, Yanagawa T, Ma D, Itoh K, Ishii Y, Kawachi Y, Ishii T (2009). Essential role of Nrf2 in keratinocyte protection from UVA by quercetin. *Biochem Biophys Res Commun* 387(1), 109–114.
- Klepacka J, Fornal Ł (2006). Ferulic acid and its position among the phenolic compounds of wheat. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 46(8), 639-647.
- Kodydková J, Vávrová L, Kocík M, Žák A (2014). Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol (Praha)* 60, 153-167.
- Kokura S, Wolf RE, Yoshikawa T, Granger DN, Aw TY (1999). Molecular mechanisms of neutrophil-endothelial cell adhesion induced by redox imbalance. *Circ Res* 84, 516-524.
- Koppenol WH (1998). The basic chemistry of nitrogen monoxide and peroxynitrite. *Free Radic Biol Med*. (4-5), 385-391.
- Koren G (1995). Fetal toxicology of environmental tobacco smoke. *Curr Opin Pediatr* (2), 128-31.
- Korkina LG, De Luca C, Kostyuk VA, Pastore S (2006). Plant polyphenols and tumors: from mechanisms to therapies, prevention, and protection against toxicity of anti-cancer treatments. *Curr Med Chem*. 16(30), 3943-3965.
- Kosheleva OV, Kodentsova VM (2013). Vitamin C in fruits and vegetables. *Vopr Pitan*. 82(3), 45-52.
- Kozłowska A, Szostak-Wegierek D (2014). Flavonoids--food sources and health benefits. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 65(2), 79-85.
- Kruk I, Aboul-Enein HY, Michalska T, Lichszteld K, Kładna A (2005). Scavenging of reactive oxygen species by the plant phenols genistein and oleuropein. *Luminescence* 20, 81-9.

- Kuppasamy P and Zweier JL, 1989. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J Biol Chem* 264, 9880-9884.
- Kwak MK, Wakabayashi N, Itoh K, Motohashi H, Yamamoto M, Kensler TW (2003). Modulation of gene expression by cancer chemopreventive dithiolethiones through the Keap1-Nrf2 pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 8135–8145.
- Lakshmi BV, Sudhakar M, Aparna M (2013). Protective potential of black grapes against lead induced oxidative stress in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 35, 361-368.
- Lange DW, Verhoef S, Gorter G, Kraaijenhagen RJ, van de Wiel A, Akkerman JW (2007). Polyphenolic grape extract inhibits platelet activation through PECAM-1: an explanation for the French paradox. *Alcohol Clin Exp Res* 31, 1308–1314.
- Latour I, Demoulin JB, Buc-Calderon P (1995). Oxidative DNA damage by t-butyl hydroperoxide causes DNA single strand breaks which is not linked to cell lysis. A mechanistic study in freshly isolated rat hepatocytes. *FEBS Letters.* 373, 299-302.
- Laughton MJ, Halliwell B, Evans PJ, Robin J, Hoult S (1989). Antioxidant and pro-oxidant actions of the plant phenolics quercetin, gossypol and myricetin: effects of lipid peroxidation, hydroxyl radical generation and bleomycin-dependent damage to DNA. *Biochem Pharmacol* 38, 2859–2864.
- Lefevre M, Wiles JE, Zhang X, Howard LR, Gupta S, Smith AA, Ju ZY, DeLany JP (2008). Gene expression microarray analysis of the effects of grape anthocyanins in mice: a test of a hypothesis-generating paradigm. *Metabolism.* 57, 52-7.

- Levine RL and Stadtman ER (2001). Oxidative modification of proteins during aging. *Exp. Gerontol* 36, 1495-1502.
- Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients* 6, 6020-6047.
- Li J, Lee JM, Johnson JA (2002). Microarrayanalysis reveals an antioxidant responsive element-driven gene set involved in conferring protection from an oxidative stress-induced apoptosis in IMR-32 cells. *J. Biol. Chem.* 277, 388–394.
- Li SG, Ding YS, Niu Q, Xu SZ, Pang LJ, Ma RL, Jing MX, Feng GL, Liu JM, Guo SX (2015). Grape seed proanthocyanidin extract alleviates arsenic-induced oxidative reproductive toxicity in male mice. *Biomed Environ Sci* 28, 272–280.
- Lijinsky W (1999). N-Nitroso compounds in the diet. *Mutat Res* 443, 129-138.
- Lima CF, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C (2006). Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life Sci.* 79, 2056-2068.
- Linnane AW, Kopsidas G, Zhang C, Yarovaya N, Kovalenko S, Papakostopoulos P, Eastwood H, Graves S, Richardson M (2002). Cellular redox activity of coenzyme Q10: effect of CoQ10 supplementation on human skeletal muscle. *Free Radic Res.* 36(4), 445-453.
- Linnane AW, Zhang C, Yarovaya N, Kopsidas G, Kovalenko S, Papakostopoulos P, Eastwood H, Graves S, Richardson M (2002). Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann NY Acad Sci* 959: 396-465.
- Liu RH (2013). Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Adv Nutr* 4(3), 384–392.



- Liu X, Chen Q, Tsai HJ, Wang G, Hong X, Zhou Y, Zhang C, Liu C, Liu R, Wang H, Zhang S, Yu Y, Mestan KK, Pearson C, Otlans P, Zuckerman B, Wang X (2014). Maternal preconception body mass index and offspring cord blood DNA methylation: exploration of early life origins of disease. *Environmental and molecular mutagenesis*, 55(3), 223-30.
- Livingstone C and Davis J (2007). Targeting therapeutics against glutathione depletion in diabetes and its complications. *Br J Diabetes Vasc Dis* 7, 258-265.
- Lotito SB, Frei B (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic Biol Med* 41, 1727–1746.
- Lu J and Holmgren A (2014). The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med* 66, 75-87.
- Lu SC (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med.* (1-2), 42-59.
- Luan SS, Yu F, Li BY, Qin RJ, Li XL, Cai Q, Yin WB, Cheng M, Gao HQ (2014). Quantitative proteomics study of protective effects of grape seed procyanidin B2 on diabetic cardiomyopathy in db/db mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 78, 1577-1583.
- Ludwig IA, Clifford MN, Lean ME, Ashihara H, Crozier A (2014). Coffee: biochemistry and potential impact on health. *Food Funct.* 5(8), 1695-1717.
- Luo G, Ducey P, McKee MD, Pinero GJ, Loyer E, Behringer RR, Karsenty G (1997). "Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein". *Nature* 386 (6620), 78–81.
- Luzak B, Kosiorek A, Syska K, Rozalski M, Bijak M, Podsedek A, Balcerczak E, Watala C, Golanski J (2014). Does grape seed extract potentiate the inhibition

- of platelet reactivity in the presence of endothelial cells? *Adv Med Sci* 59, 178-182.
- Lyras L, Cairns NJ, Jenner A, Halliwell B (1977). "An assessment of oxidative damage to proteins, lipids and DNA in brain from patients with Alzheimer's Disease", *J Neurochem*, 68 (5), 2061-2069.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability (2004). *Am J Clin Nutr*. 79(5), 727-747.
- Mansouri E, Khorsandi L, Abdollahzade Fard A (2015). Protective role of grape seed proanthocyanidin antioxidant properties on heart of streptozotocin-induced diabetic rats. *Vet Res Forum*. 6(2):119-124.
- Martín C, Martínez P, Navarro R, Ruiz-Sanz JJ, Lacort M, Ruiz-Larrea MB (2000). Tert-Butyl hydroperoxide-induced lipid signaling in hepatocytes: involvement of glutathione and free radicals. *Biochem. Pharm.* 62, 705–712.
- Masters C, Pegg M, Crane D (1986). On the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver. *Mol Cell Biochem* 70(2), 113-120.
- Mathew S, Abraham TE (2006). Bioconversions of ferulic acid, an hydroxycinnamic acid. *Crit Rev Microbiol*. 32(3), 115-125.
- Matthaiou CM, Goutzourelas N, Stagos D, Sarafoglou E, Jamurtas A, Koulocheri SD, Haroutounian SA, Tsatsakis AM, Kouretas D (2014). Pomegranate juice consumption increases GSH levels and reduces lipid and protein oxidation in human blood. *Food Chem Toxicol* 73, 1-6.
- May JM, Qu ZC, Neel DR, Li X (2003). Recycling of vitamin C from its oxidized forms by human endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*. 1640(2-3), 153-161.
- McClung JM, Deruisseau KC, Whidden MA, Van Remmen H, Richardson A, Song W, Vrabas IS, Powers SK (2010). Overexpression of antioxidant enzymes in

- diaphragm muscle does not alter contraction-induced fatigue or recovery. *Exp Physiol* 95, 222-231.
- Meeus M, Nijs J, Hermans L, Goubert D, Calders P (2013). The role of mitochondrial dysfunctions due to oxidative and nitrosative stress in the chronic pain or chronic fatigue syndromes and fibromyalgia patients: Peripheral and central mechanisms as therapeutic targets? *Expert Opin Ther Targets* 17, 1081-1089.
- Mendoza-Cózatl D, Loza-Tavera H, Hernández-Navarro A, Moreno-Sánchez R (2005). Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol Rev.* 29(4), 653-671.
- Meneghini R (1997). Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free Radic Biol Med* 23(5), 783-792, Review.
- Meng JF, Fang YL, Qin MY, Zhuang XF, Zhang ZW (2012). Varietal differences among the phenolic profiles and antioxidant properties of four cultivars of spine grape (*Vitis davidii* Foex) in Chongyi County (China). *Food Chem* 134, 2049-2056.
- Meydani M, Evans W, Handelman G, Fielding RA, Meydani SN, Fiatarone MA, Blumberg JB, Cannon JG (1992). Antioxidant response to exercise-induced oxidative stress and protection by vitamin E. *Ann N Y Acad Sci.* 669, 363-364.
- Migliori M, Cantaluppi V, Mannari C, Bertelli AA, Medica D, Quercia AD, Navarro V, Scatena A, Giovannini L, Biancone L, Panichi V (2015). Caffeic acid, a phenol found in white wine, modulates endothelial nitric oxide production and protects from oxidative stress-associated endothelial cell injury. *PLoS One* 10, e0117530.
- Milenkovic D, Vanden Berghe W, Boby C, Leroux C, Declerck K, Szarc vel Szic K, Heyninck K, Laukens K, Bizet M, Defrance M (2014). Dietary flavanols

- modulate the transcription of genes associated with cardiovascular pathology without changes in their DNA methylation state. *PLoS One* 24, e95527.
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Copinathan V, Milner A (1993). A novel measuring anti-oxidant capacity and application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci* 84, 407-412.
- Mohan IK, Das UN (1997). Oxidant stress, anti-oxidants and essential fatty acids in systemic lupus erythematosus. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 56(3), 193-8.
- Montesano A, Luzi L, Senesi P, Mazzocchi N, Terruzzi I (2013). Resveratrol promotes myogenesis and hypertrophy in murine myoblasts. *J Transl Med*. 13;11, 310.
- Moura CF, Ribeiro FA, de Jesus GP, da Silva VH, Oshima CT, Gollücke AP, Aguiar O Jr, Ribeiro DA (2014). Antimutagenic and antigenotoxic potential of grape juice concentrate in blood and liver of rats exposed to cadmium. *Environ Sci Pollut Res Int*. 21(22), 13118-13126.
- Munroe PB, Olgunturk RO, Fryns JP, Van Maldergem L, Ziereisen F, Yuksel B, Gardiner RM, Chung E (1999). "Mutations in the gene encoding the human matrix Gla protein cause Keutel syndrome". *Nat. Genet*. 21 (1), 142-4.
- Murakami C, Hirakawa Y, Inui H, Nakano Y, Yoshida H (2002). Effect of tea catechins on cellular lipid peroxidation and cytotoxicity in HepG2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 66, 1559-1562.
- Myhrstad MC, Carlsen H, Nordström O, Blomhoff R, Moskaug JØ (2002). Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic Biol Med* 32, 386-393.

- Mylonas C and Kouretas D (1999). Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo* 13(3), 295-309.
- Naito Y, Yoshikawa T, Yoshiba N, Kondo M (1998). Role of oxygen radical and lipid peroxidation in idomethanic-induced gastric mucosal injury. *Dig Dis Sci* 43, 30-34.
- Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 74, 418–425.
- Nikolaidis MG, Kyparos A, Hadziioannou M, Panou N, Samaras L, Jamurtas AZ, Kouretas D (2007). Acute exercise markedly increases blood oxidative stress in boys and girls. *Appl Physiol Nutr Metab* 32, 197-205.
- Nikolaidis MG, Paschalis V, Giakas G, Fatouros IG, Koutedakis Y, Kouretas D, Jamurtas AZ (2007). Decreased blood oxidative stress after repeated muscle-damaging exercise. *Med Sci Sports Exerc* 39(7), 1080–1089.
- Njålsson R, Norgren S (2005). Physiological and pathological aspects of GSH metabolism. *Acta Paediatr.* 4(2), 132-137.
- Nunes-Silva A, Bernardes PT, Rezende BM, Lopes F, Gomes EC, Marques PE, Lima PM, Coimbra CC, Menezes GB, Teixeira MM, Pinho V (2014). Treadmill exercise induces neutrophil recruitment into muscle tissue in a reactive oxygen species dependent manner. An intravital microscopy study. *PLoS One* 9: e96464.
- Oak MH, Bedoui JE, Madeira SV, Chalupsky K, Schini-Kerth VB (2006). Delphinidin and cyanidin inhibit PDGF(AB)-induced VEGF release in vascular smooth muscle cells by preventing activation of p38 MAPK and JNK. *Br J Pharmacol* 149(3), 283–290.

- Obata T, Yamanaka Y, Kinemuchi H, Orelan L (2001). Release of dopamine by perfusion with 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP(+)) into the striatum is associated with hydroxyl free radical generation. *Brain Res* 906, 170-175.
- Oberley LW and Spitz DR (1984). Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol* 105, 457-464.
- Oberley TD, Oberley LW (1997). Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol Histopathol.* 12(2), 525-535.
- Orhan N, Aslan M, Orhan DD, Ergun F, Yeşilada E (2006). In-vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (*Vitis vinifera*) in diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 108(2), 280–286.
- Ou TT, Lin MC, Wu CH, Lin WL, Wang CJ (2013). Gallic acid attenuates oleic acid-induced proliferation of vascular smooth muscle cell through regulation of AMPK-eNOS-FAS signaling. *Curr Med Chem*, 20(31): 3944-53.
- Pajuelo D, Díaz S, Quesada H, Fernández-Iglesias A, Mulero M, Arola-Arnal A, Salvadó MJ, Bladé C, Arola L (2011). Acute administration of grape seed proanthocyanidin extract modulates energetic metabolism in skeletal muscle and BAT mitochondria nutrigenomics group. *Agric Food Chem* 59: 4279-4287.
- Pajuelo D, Fernández-Iglesias A, Díaz S, Quesada H, Arola-Arnal A, Bladé C, Salvadó J, Arola L (2011). Improvement of mitochondrial function in muscle of genetically obese rats after chronic supplementation with proanthocyanidins. *J Agric Food Chem* 59: 8491-8498.
- Pajuelo D, Quesada H, Díaz S, Fernández-Iglesias A, Arola-Arnal A, Bladé C, Salvadó J, Arola L (2012). Chronic dietary supplementation of proanthocyanidins corrects the mitochondrial dysfunction of brown adipose

- tissue caused by diet-induced obesity in Wistar rats. *Br J Nutr* 107(2), 170–178.
- Pascual-Teresa S, Moreno DA, García-Viguera C (2010). Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: a review of current evidence. *Int J Mol Sci*. 11(4), 1679-1703.
- Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatou F, Matsokis NA (2004). Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett* 357, 83-86.
- Petretto E, Sarwar R, Grieve I, Lu H, Kumaran MK, Muckett PJ, Mangion J, Schroen B, Benson M, Punjabi PP, Prasad SK, Pennell DJ, Kieseewetter C, Tasheva ES, Corpuz LM, Webb MD, Conrad GW, Kurtz TW, Kren V, Fischer J, Hubner N, Pinto YM, Pravenec M, Aitman TJ, Cook SA (2008). "Integrated genomic approaches implicate osteoglycin (Ogn) in the regulation of left ventricular mass". *Nat. Genet.* 40 (5), 546–52.
- Petrone WF, English DK, Wong K, McCord JM (1980). Free radicals and inflammation: superoxide-dependent activation of a neutrophil chemotactic factor in plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2), 1159-1163.
- Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C (2008). Free Radicals, Antioxidants in Diseases and Health. *Int J Biomed Sci*. 4, 89-96.
- Phaneuf S and Leeuwenburgh C (2001). Apoptosis and exercise. *Med Sci Sports Exerc* 33, 393-396.
- Pietta PG (2000). Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63, 1035–1042.

- Pines J, Hunter T (1989). "Isolation of a human cyclin cDNA: evidence for cyclin mRNA and protein regulation in the cell cycle and for interaction with p34cdc2". *Cell* 58 (5), 833–46.
- Pinto JP, Conceição N, Gavaia PJ, Cancela ML (2003). "Matrix Gla protein gene expression and protein accumulation colocalize with cartilage distribution during development of the teleost fish *Sparus aurata*". *Bone* 32 (3), 201–10.
- Pischke SE, Zhou Z, Song R, Ning W, Alam J, Ryter SW, Choi AM (2005). Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway mediates heme oxygenase-1 regulation by lipopolysaccharide. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 51(5), 461-470
- Poljsak B and Milisav I (2012). The neglected significance of ‘‘antioxidative stress’’. *Oxid Med Cell Longev* 2012, 480895.
- Prior RL, Wu X, Schaich K (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J Agric Food Chem* 53, 4290-4302.
- Procházková D, Boušová I, Wilhelmová N (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 82(4), 513-523.
- Puka-Sundvall M, Eriksson P, Nilsson M, Sandberg M, Lehmann A (1995). Neurotoxicity of cysteine: interaction with glutamate. *Brain Res*. 705(1-2), 65-70.
- Pyne DB (1994). Regulation of neutrophil function during exercise. *Sports Med*. 1994 (4), 245-258.
- Quintana-Cabrera R and Bolanos JP (2013). Glutathione and g-glutamylcysteine in the antioxidant and survival functions of mitochondria. *Biochem Soc Trans* 41(1), 106–110.



- Radák Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvári M, Nyakas C, Goto S (1999). The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins, and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med*. 27(1-2), 69-74.
- Rahman I, Biswas SK, Kirkham PA (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. *Biochem Pharmacol*. 72(11), 1439-1452.
- Rangel-Huerta OD, Aguilera CM, Martin MV, Soto MJ, Rico MC, Vallejo F, Tomas-Barberan F, Perez-de-la-Cruz AJ, Gil A, Mesa MD (2015). Normal or High Polyphenol Concentration in Orange Juice Affects Antioxidant Activity, Blood Pressure, and Body Weight in Obese or Overweight Adults. *J Nutr*. 145(8), 1808-1816.
- Rav RS, Mehrotra S, Shanker U, Babu GS, Joshi PC, Hanss RK (2001). Evaluation of UV-induced superoxide radical generation potential of some common antibiotics. *Drug Chem Toxicol* 24, 191-200.
- Reid MB (2001). Plasticity in skeletal, cardiac, and smooth muscle Invited review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 90, 724-731.
- Reid MB (2008). Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC. *Free Radic Biol Med* 44, 169-179.
- Renaud S, de Lorgeril M (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339, 1523–1526.
- Rhee SG (2006). Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. *Science* 312: 1882-1883.

- Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G (1996). Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20, 933–956.
- Rimbach G, Höhler D, Fischer A, Roy S, Virgili F, Pallauf J, Packer L (1999). Methods to assess free radicals and oxidative stress in biological systems. *Arch Tierernahr.* 52(3), 203-22.
- Rodriguez-Rodriguez R, Justo ML, Claro CM, Vila E, Parrado J, Herrera MD Alvarez de Sotomayor M (2012). Endothelium-dependent vasodilator and antioxidant properties of a novel enzymatic extract of grape pomace from wine industrial waste. *Food Chem* 135: 1044-1051.
- Saada HN, Said UZ, Meky NH, Abd El Azime AS (2009). Grape seed extract *Vitis vinifera* protects against radiation-induced oxidative damage and metabolic disorders in rats. *Phytother Res* 23, 434-438.
- Sahpazidou D, Geromichalos GD, Stagos D, Apostolou A, Haroutounian SA, Tsatsakis AM, Tzanakakis GN, Hayes AW, Kouretas D: Anticarcinogenic activity of polyphenolic extracts from grape stems against breast, colon, renal and thyroid cancer cells. *Toxicol Lett* 230, 218-224.
- Sakata Y, Zhuang H, Kwansa H, Koehler RC, Doré S (2010): Resveratrol protects against experimental stroke: Putative neuroprotective role of heme oxygenase 1. *Exp Neurol* 224, 325-329.
- Sakran M, Selim Y, Zidan N (2014). A new isoflavonoid from seeds of *Lepidium sativum* L. and its protective effect on hepatotoxicity induced by paracetamol in male rats. *Molecules*.19(10), 15440-15451.
- Samaras A, Tsarouhas K, Paschalidis E, Giamouzis G, Triposkiadis F, Tsitsimpikou C, Becker AT, Goutzourelas N, Kouretas D (2014). Effect of a special

- carbohydrate-protein bar and tomato juice supplementation on oxidative stress markers and vascular endothelial dynamics in ultra-marathon runners. *Food Chem Toxicol* 69, 231-236.
- Samman S, Soto C, Cooke L, Ahmad Z, Farmakalidis E (1996). Is erythrocyte alkaline phosphatase activity a marker of zinc status in humans? *Biol Trace Elem Res.* 51(3), 285-291.
- Sang S, Tian S, Wang H, Stark RE, Rosen RT, Yang CS, Ho CT (2003). Chemical studies of the antioxidant mechanism of tea catechins: radical reaction products of epicatechin with peroxy radicals. *Bioorg Med Chem* 11(16), 3371–3378.
- Schneider BS, Tiidus PM (2007). Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: How do we resolve the controversy? *Sports Med* 37, 837-856.
- Sen CK (2001). Update on thiol status and supplements in physical exercise. *Can J Appl Physiol.* 26, 4-12.
- Sen' VD, Golubev VA, Volkova LM, Konovalova NP (1996). Synthesis and antitumor activity of platinum (II) complexes with trans-3,4-diamino-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl. *J Inorg Biochem.* 64(1), 69-77.
- Shanmuganayagam D, Warner TF, Krueger CG, Reed JD, Folts JD (2007). Concord grape juice attenuates platelet aggregation, serum cholesterol and development of atheroma in hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis.* 190(1), 135-142.
- Sharma SD, Meeran SM, Katiyar SK (2007). Dietary grape seed proanthocyanidins inhibit UVB-induced oxidative stress and activation of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB signaling in in vivo SKH-1 hairless mice. *Mol Cancer Ther.* 6(3), 995-1005.

- Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem J.* 2001 Nov 15;360(Pt 1):1-16.
- Sies H (1991). Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr.* 69(21-23), 965-968.
- Sies H (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med.* 27(9-10), 916-921.
- Sies H, Summer KH (1975). Hydroperoxide-metabolizing systems in rat liver. *Eur. J. Biochem.* 57, 503-512.
- Simantov R, Silverstein RL (2003). "CD36: a critical anti-angiogenic receptor". *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 8 (1-3), 874-82.
- Singh BN, Shankar S, Srivastava RK (2011). Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 82(12), 1807-1821.
- Sjödin B, Hellsten Westing Y, Apple FS (1990). Biochemical mechanisms for oxygen free radical formation during exercise. *Sports Med.* 10(4), 236-254.
- Skibola CF, Smith MT (200). Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radic Biol Med.* 29(3-4), 375-83.
- Slauch JM (2011). How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Mol Microbiol* 80(3), 580-583.
- Soares De Moura, R Costa Viana FS, Souza MA, Kovary K, Guedes DC, Oliveira EP, Rubenich LM, Carvalho LC, Oliveira RM, Tano T, Gusmão Correia ML (2002). Antihypertensive, vasodilator and antioxidant effects of a vinifera

- grape skin extract. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 54(11), 1515–1520.
- Soleas GJ, Diamandidis ER, Goldberg DM (1997). Wine as a Biological Fluid: History, Production, and Role in Disease Prevention, *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 11, 287-313.
- Son Y, Lee JH, Chung HT, Pae HO (2013). Therapeutic roles of heme oxygenase-1 in metabolic diseases: Curcumin and resveratrol analogues as possible inducers of heme oxygenase-1. *Oxid Med Cell Longev* 2013, 639541.
- Song Q, Shi Z, Bi W, Liu R, Zhang C, Wang K Dang X (2015). Beneficial effect of grape seed proanthocyanidin extract in rabbits with steroid-induced osteonecrosis via protecting against oxidative stress and apoptosis. *J Orthop Sci* 20, 196-204.
- Soria JC, Jang SJ, Khuri FR, Hassan K, Liu D, Hong WK, Mao L (2000). "Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication". *Cancer Res.* 60 (15), 4000–4.
- Spanou C, Veskoukis AS, Stagos D, Liadaki K, Anastasiadi M, Haroutounian SA, Tsouka M, Tzanakouli E Kouretas D (2011). Effects of grape extracts on the in vitro activity of enzymes involved in oxidative stress regulation. *In Vivo* 25, 657-662.
- Spanou C, Veskoukis AS, Stagos D, Liadaki K, Anastasiadi M, Haroutounian SA, Tsouka M, Tzanakouli E, Kouretas D (2011). Effects of grape extracts on the in vitro activity of enzymes involved in oxidative stress regulation. *In Vivo* 25, 657-662.

- Sri Harsha PS, Mesias M, Lavelli V, Morales FJ (In press). Grape skin extracts from winemaking by-products as a source of trapping agents for reactive carbonyl species. *J Sci Food Agric* (In press).
- Stagos D, Apostolou A, Poulios E, Kermeliotou E, Mpatzilioti A, Kreatsouli K, Koulocheri SD, Haroutounian SA, Kouretas D (2014). Antiangiogenic potential of grape stem extract through inhibition of vascular endothelial growth factor expression. *J Physiol Pharmacol* 65, 843-852.
- Stagos D, Kazantzoglou G, Magiatis P, Mitaku S, Anagnostopoulos K, Kouretas D (2005). Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* on Mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA. *Int J Mol Med* 15(6), 1013-1022.
- Stagos D, Kazantzoglou G, Theofanidou D, Kakalopoulou G, Magiatis P, Mitaku S and Kouretas D: Activity of grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* against mutagenicity induced by bleomycin and hydrogen peroxide in *Salmonella typhimurium* strain TA102. *Mutat Res* 609: 165-175, 2006.
- Stagos D, Spanou C, Margariti M, Stathopoulos C, Mamuris Z, Kazantzoglou G, Magiatis P, Kouretas D (2007). Cytogenetic effects of grape extracts (*Vitis vinifera*) and polyphenols on mitomycin C-induced sister chromatid exchanges (SCEs) in human blood lymphocytes. *J Agric Food Chem* 55, 5246-5252.
- St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J Biol Chem* 277(47), 44784-44790.
- Sun W, Qiu G, Zou Y, Cai Z, Wang P, Lin X, Huang J, Jiang L, Ding X, Hu G (2015). Knockdown of TMEM45A inhibits the proliferation, migration and invasion of glioma cells. *Int J Clin Exp Pathol* 1;8(10), 12657-67.

- Sun Y, Oberley LW (1989). The inhibition of catalase by glutathione. *Free Radic Biol Med.* 7(6), 595-602.
- Sung MM, Dyck JR (2015). Therapeutic potential of resveratrol in heart failure. *Ann N Y Acad Sci.* 1348(1), 32-45.
- Suzuki T, Urano T, Miki Y, Moriya T, Akahira J, Ishida T, Horie K, Inoue S, Sasano H (2007). "Nuclear cyclin B1 in human breast carcinoma as a potent prognostic factor". *Cancer Sci.* 98 (5), 644–51.
- Szczesna-Cordary D, Guzman G, Zhao J (2005). "The E22K mutation of myosin RLC that causes familial hypertrophic cardiomyopathy increases calcium sensitivity of force and ATPase in transgenic mice.". *J. Cell. Sci.* 118 (Pt 16), 3675–83..
- Takahashi A, Inoue H, Mishima K, Ide F, Nakayama R, Hasaka A, Ryo K, Ito Y, Sakurai T, Hasegawa Y, Saito I (2015). Evaluation of the Effects of Quercetin on Damaged Salivary Secretion. *PLoS One*, 10(1): e0116008.
- Talalay P, Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD (2003). Importance of phase 2 gene regulation in protection against electrophile and reactive oxygen toxicity and carcinogenesis. *Adv.Enzyme Regul.* 43, 121–134.
- Terra, Montagut G, Bustos M, Llopiz N, Ardèvol A, Bladé C, Fernández-Larrea J, Pujadas G, Salvadó J, Arola L, Blay M. 2009. Grape-seed procyanidins prevent low-grade inflammation by modulating cytokine expression in rats fed a high-fat diet. *The Journal of nutritional biochemistry.* 20(3), 210–218.
- Trapani JA (1996). "Target cell apoptosis induced by cytotoxic T cells and natural killer cells involves synergy between the pore-forming protein, perforin, and the serine protease, granzyme B". *Australian and New Zealand journal of medicine* 25 (6), 793–9.

- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullos M (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf*. 64(2), 178-189.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*. 266(1-2), 37-56.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44-84.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 160(1), 1-40.
- Vermeris W, Nicholson R (2006). Phenolic compound biochemistry. Springer.
- Veskoukis AS, Kyparos A, Nikolaidis MG, Stagos D, Aligiannis N, Halabalaki M, Chronis K, Goutzourelas N, Skaltsounis L, Kouretas D (2012). The antioxidant effects of a polyphenol-rich grape pomace extract in vitro do not correspond in vivo using exercise as an oxidant stimulus. *Oxid Med Cell Longev* 2012, 185867.
- Veskoukis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, Kokkinos D, Nepka C, Barbanis S, Kouretas D (2008). Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Appl Physiol Nutr Metab* 33(6), 1140–1154.
- Victor VM, Rocha M, Solá E, Bañuls C, Garcia-Malpartida K, Hernández Mijares A (2009). Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Curr Pharm Des* 15, 2988-3002.



- Victoria J, Brémond A, Courtial I (1994). Incidence of breast cancer in the Rhône area--influence of urban or rural character of the communities and of the population density. *Rev Epidemiol Sante Publique* (4), 301-306.
- Viña J, Gomez-Cabrera MC, Lloret A, Marquez R, Miñana JB, Pallardó FV, Sastre J (2000). Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life*. 450(4-5), 271-277.
- Visioli F, Bellomo G, Galli C (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochem Biophys Res Com* 247, 60–64.
- Vislocky LM & Fernandez ML (2010). Biomedical effects of grape products. *Nutrition reviews*, 68(11), 656–670.
- Von Sonntag C (1987). New aspects in the free-radical chemistry of pyrimidine nucleobases. *Free Radic Res Commun* 2(4-6), 217-224.
- Wells PG, McCallum GP, Chen CS, Henderson JT, Lee CJ, Perstin J, Preston TJ, Wiley MJ, Wong AW (2009). Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicol Sci* 108(1), 4–18.
- Whiteman M, Rose P, Siau JL, Cheung NS, Tan GS, Halliwell B, Armstrong JS (2005). Hypochlorous acid-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis in human hepatoma HepG2 and human fetal liver cells: role of mitochondrial permeability transition. *Free Radic Biol Med* 38(12), 1571-1584.
- Widyarini S, Domanski D, Painter N, Reeve VE (2012). Photoimmune protective effect of the phytoestrogenic isoflavonoid equol is partially due to its antioxidant activities. *Photochem Photobiol Sci*. 11(7), 1186-1192.
- Wijeratne SS, Abou-Zaid MM, Shahidi F (2006). Antioxidant polyphenols in almond and its coproducts. *J Agric Food Chem*. 54(2), 312-8.

- Wilms LC, Kleinjans JC, Moonen EJ, Briedé JJ (2008). Discriminative protection against hydroxyl and superoxide anion radicals by quercetin in human leucocytes in vitro. *Toxicol In Vitro* 22, 301–307.
- Wormser U, Brodsky B, Green BS, Arad-Yellin R, Nyska A (2000). Protective effect of povidone iodine ointment against skin lesions induced by chemical and thermal stimuli. *J Appl Toxicol*. 20, Suppl 1, 183-185.
- Woywodt A, Bahlmann FH, De Groot K, Haller H, Haubitz M (2002). Circulating endothelial cells: Life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol Dial Transplant* 17, 1728-1730.
- Wu L, Li X, Li Y, Wang L, Tang Y, Xue M (2009). Proliferative inhibition of danxiongfang and its active ingredients on rat vascular smooth muscle cell and protective effect on the VSMC damage induced by hydrogen peroxide. *J Ethnopharmacol* 126, 197-206.
- Xia EQ, Deng GF, Guo YJ, Li HB (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *Int J Mol Sci*. 11(2), 622-646.
- Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S (1999). Oxidative stress causes enhanced endothelial cell injury in human heme oxygenase-1 deficiency. *J Clin Invest*. 103(1), 129-135.
- Yang HL, Huang PJ, Liu YR, Kumar KJ, Hsu LS, Lu TL, Chia YC, Takajo T, Kazunori A, Hseu YC (2014). *Toona sinensis* inhibits LPS-induced inflammation and migration in vascular smooth muscle cells via suppression of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2014, 901315.

- Yang J, Song H, Walsh S, Bardes ES, Kornbluth S (2001). "Combinatorial control of cyclin B1 nuclear trafficking through phosphorylation at multiple sites". *J. Biol. Chem.* 276 (5), 3604–9.
- Yang J, Xiao YY (2013). Grape phytochemicals and associated health benefits. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 53(11), 1202-1225.
- Yang T, Li X, Zhu W, Chen C, Sun Z, Tan Z, Kang J (2014). Alteration of antioxidant enzymes and associated genes induced by grape seed extracts in the primary muscle cells of goats in vitro. *PLoS One* 9, e107670.
- Yao Y, Jumabay M, Ly A, Radparvar M, Cubberly MR, Boström KI (2013). "A role for the endothelium in vascular calcification". *Circ. Res.* 113 (5), 495–504.
- Yen GC, Duh PD, Tsai HL, Huang SL (2003). Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 1215–1222.
- Yen GC, Duh PD (1994). Scavenging effect of methanolic extracts of peanut hulls on free radical and active oxygen species. *J. Agricult. Food Chem.* 42, 629–632.
- Yoshimura M (2014). Structure elucidation of antioxidative polyphenols and their biological properties. *Yakugaku Zasshi* 134: 957-964.
- Yoshino M, Naka A, Sakamoto Y, Shibasaki A, Toh M, Tsukamoto S, Kondo K, Iida K (2015). Dietary isoflavone daidzein promotes Tfam expression that increases mitochondrial biogenesis in C2C12 muscle cells. *J Nutr Biochem* 26(11), 1193-9.
- Young IS, McEneny J (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans.* 29(Pt 2), 358-362.
- Yousef MI, Saad AA, El-Shennawy LK (2009). Protective effect of grape seed proanthocyanidin extract against oxidative stress induced by cisplatin in rats. *Food Chem Toxicol* 47, 1176-1183.

- Yu BP (1994). Cellular defences against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74: 139-162.
- Yunoki K, Sasaki G, Tokuji Y, Kinoshita M, Naito A, Aida K, Ohnishi M (2008). Effect of dietary wine pomace extract and oleanolic acid on plasma lipids in rats fed high-fat diet and its DNAmicroarray analysis. *J Agric Food Chem*. 56(24), 12052-8.
- Zamora-Ros R, Rothwell JA, Scalbert A, Knaze V, Romieu I, Slimani N, Fagherazzi G, Perquier F, Touillaud M, Molina-Montes E, Huerta JM, Barricarte A, Amiano P, Menéndez V, Tumino R, de Magistris MS, Palli D, Ricceri F, Sieri S, Crowe FL, Khaw KT, Wareham NJ, Grote V, Li K, Boeing H, Förster J, Trichopoulou A, Benetou V, Tsiotas K, Bueno-de-Mesquita HB, Ros M, Peeters PH, Tjønneland A, Halkjær J, Overvad K, Ericson U, Wallström P, Johansson I, Landberg R, Weiderpass E, Engeset D, Skeie G, Wark P, Riboli E, González CA (2013). Dietary intakes and food sources of phenolic acids in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Br J Nutr*. 2013 110(8), 1500-1511.
- Zhang X and Hu Y (2012). Inhibitory effects of grape seed proanthocyanidin extract on selenite-induced cataract formation and possible mechanism. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 32: 613-619.
- Zhen J, Qu Z, Fang H, Fu L, Wu Y, Wang H, Zang H, Wang W (2014). Effects of grape seed proanthocyanidin extract on pentylenetetrazole-induced kindling and associated cognitive impairment in rats. *Int J Mol Med* 34, 391-398.
- Zhu L, Zhang Y, Deng J, Li H, Lu J (2012). Phenolic concentrations and antioxidant properties of wines made from north american grapes grown in china. *Molecules* 17: 3304-3323.

- Zou Y, Yoon S, Jung KJ, Kim CH, Son TG, Kim MS, Kim YJ, Lee J, Yu BP, Chung HY (2006). Upregulation of aortic adhesion molecules during aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61, 232-244.
- Δ. Μπόσκου (1997). Χημεία Τροφίμων. Εκδόσεις Γαρταγάνη Θεσσαλονίκη
- Παπαγεωργίου Γεώργιος (2005). Βιοχημεία ελεύθερων ριζών, αντιοξειδωτικά και λιπιδική υπεροξειδωση. Θεσσαλονίκη: university studio press.

## Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells

N Goutzourelas<sup>1</sup>, D Stagos<sup>1</sup>, N Demertzis<sup>1</sup>, P Mavridou<sup>1</sup>,  
H Karterolioti<sup>1</sup>, S Georgiadakis<sup>1</sup>, E Kerasioti<sup>1</sup>, N Aligiannis<sup>2</sup>,  
L Skaltsounis<sup>2</sup>, A Statiri<sup>1</sup>, A Tsioutsouliti<sup>1</sup>, AM Tsatsakis<sup>3</sup>,  
AW Hayes<sup>4,5</sup> and D Kouretas<sup>1</sup>

### Abstract

A grape pomace extract enhanced antioxidant mechanisms in muscle and endothelial cells both in the absence and in the presence of oxidative stress-induced agent tert-butyl hydroperoxide (tBHP). In particular, muscle (C2C12) and endothelial (EA.hy926) cells were treated with the extract at noncytotoxic concentrations for 24 h, and the oxidative stress markers, total reactive oxygen species (ROS), glutathione (GSH), thiobarbituric reactive substances (TBARS), and protein carbonyl levels were assessed. The results showed that the grape extract treatment reduced significantly ROS, TBARS, and protein carbonyl levels and increased GSH in C2C12 cells, while it increased GSH and decreased protein carbonyl levels in EA.hy926 cells. In the presence of tBHP, the grape extract treatment in C2C12 cells reduced significantly ROS, TBARS, and protein carbonyls and increased GSH compared with tBHP alone treatment, while, in EA.hy926 cells, the extract decreased significantly TBARS and protein carbonyls but increased GSH. The antioxidant potency of the extract was different between muscle and endothelial cells suggesting that the antioxidant activity depends on cell type. Moreover, the antioxidant activity of the grape extract, in both cell lines, exerted, at least in part, through increase in GSH levels. The present work is the first to report the effects of grape extract shown for skeletal muscle cells.

### Keywords

Grape extract, muscle cells, endothelial cells, oxidative stress

### Introduction

It is well known that every living organism is exposed to oxygen (O<sub>2</sub>) free radicals under various conditions. Free radicals are produced under physiological conditions and participate in different functions of the cell as regulation of signaling pathways, gene expression, normal apoptosis, and physiological adaptations during exercise.<sup>1–4</sup> In addition, free radicals can be produced under abnormal conditions such as poor diet, smoking, exposure to ionizing and ultraviolet radiation.<sup>5,6</sup> The overproduction of free radicals can cause oxidative damage to macromolecules, the immune system, and muscles and can induce fatigue.<sup>7–10</sup> However, every living organism has antioxidant mechanisms to address the overproduction of free radicals.<sup>11</sup> The antioxidant protective mechanisms act in order to keep a balance between free radical production and

scavenging. A disturbance of this equilibrium results in the appearance of oxidative stress, a pathophysiological condition potentially leading to several diseases.<sup>12</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa, Greece

<sup>2</sup>Division of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry, School of Pharmacy, University of Athens, Panepistimiopolis Zografou Athens, Greece

<sup>3</sup>Department of Forensic Sciences and Toxicology, Medical School, University of Crete, Heraklion, Greece

<sup>4</sup>Harvard School of Public Health, Boston, MA, USA

<sup>5</sup>Spherix Consulting, Inc., Bethesda, MD, USA

### Corresponding author:

D Kouretas, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Ploutonos 26 & Aiolou St, Larissa 41221, Greece.

Email: dkouretas@uth.gr



Oxidative stress occurs frequently in muscle tissue exposed to reactive oxygen species (ROS) production. For example, during intense exercise there is a high rate of O<sub>2</sub> consumption in skeletal muscles that can cause incomplete O<sub>2</sub> reduction and electron leakage from the electron transfer chain and lead to the generation of ROS causing oxidative stress and resulting in muscle fatigue and cell damage and apoptosis.<sup>13,14</sup>

Moreover, the damage of the vascular endothelium by oxidative stress may lead to various diseases.<sup>15</sup> As shown by Kokura et al. and Hazel and Müller,<sup>16,17</sup> a redox imbalance in endothelial cells results in surface expression of different endothelial cell adhesion molecules, suggesting that oxidant stress induces acute and chronic phases of leukocyte adhesion to the endothelium.

Due to the adverse consequences of oxidative stress on human health, it has been suggested by us and others that antioxidant supplementation may relieve the problem.<sup>18,19</sup> Thus, plant foods rich in antioxidants have been shown to have beneficial effects on human health.<sup>20</sup> Over the last several years, grape extracts and wine have been the center of attention due to their strong antioxidant properties. Our research group has shown that grape extracts exhibited high antioxidant activity and prevented ROS-induced DNA damage.<sup>21–23</sup> The antioxidant effects of grape extracts are attributed mainly to their rich polyphenolic content.<sup>22,24</sup>

The aim of the present study was to investigate the effects of a grape pomace extract rich in polyphenols on the redox status of muscle and endothelial cells both in the absence and in the presence of an oxidative stress agent. The investigation of the antioxidant effects of the grape extract at the cellular level would help understanding the molecular mechanisms through which this activity is exerted. Because such extracts are used as food supplements, understanding the effects of the extract on these systems is important. Soil and climatic conditions affect the phenolic composition of the grapes due to its influence on biochemical synthesis of these compounds, and consequently, the investigation of the biological properties of local varieties also is important.<sup>25</sup>

## Materials and methods

### Chemicals, reagents, and culture medium

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), phosphate-buffered saline (PBS), and trypsin were purchased from Gibco (Grand Island,

New York, USA). Tert-butyl hydroperoxide (tBHP), 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA), mercury orange, trichloroacetic acid (TCA), Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), sodium sulfate (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 2-thiobarbituric acid (TBA), and Bradford's reagent were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, Missouri, USA). Cell proliferation kit II (XTT) was purchased from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany).

### Extract preparation

The grape pomace extract was prepared from the Greek *Vitis vinifera* variety of Batiki Tymavou (red grapes grown in central Greece). The extract isolation was performed as described by Veskoulis et al. previously.<sup>26</sup> In brief, the raw material was dried in a shady, well-ventilated place and extracted with ethanol (96%) at 50°C for 4 h. After filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue (grape pomace extract) was kept at –20°C until further use.

### Cell culture conditions

C2C12 muscle cells were gifted from Prof. Koutsilieris (National and Kapodistrian University of Athens, Greece) and EA.hy926 cells from Prof. Koukoulis (University of Thessaly, Greece). All cells were cultured in normal DMEM (Gibco, UK), containing 10% (v/v) FBS, 2 mM L-glutamine (Gibco, UK), 100 units/mL of penicillin, and 100 units/mL of streptomycin (Gibco, UK) in plastic disposable tissue culture flasks at 37°C in 5% carbon dioxide.

### Cell viability assay

Cell viability was assessed using the XTT assay kit (Roche). Briefly, cell lines were subcultured into a 96-well plate with  $1 \times 10^4$  and  $5 \times 10^3$  cells per well for C2C12 and EA.hy926 cell line, respectively, in DMEM medium. After 24 h incubation, the cells were treated with different concentrations of the grape extract in serum-free DMEM medium for 24 h. Then, 50 µL of XTT test solution, which was prepared by mixing 50 µL of XTT labeling reagent with 1 µL of electron coupling reagent, was added to each well. After 4 h of incubation, absorbance was measured at 450 nm and also at 690 nm as a reference wavelength in a Bio-Tek ELx800 microplate reader (Winooski, Vermont, USA). DMEM serum-free medium was used as a negative control. Also, absorbance of the



grape extract concentration alone in DMEM serum-free medium and XTT test solution was tested at 450 nm. The absorbance values of the grape extracts alone were subtracted from those derived from cell treatment with the grape extracts. Data were calculated as percentage of inhibition by the following formula:

$$\text{Inhibition(\%)} = \frac{(\text{OD control} - \text{OD sample})}{\text{OD control}} \times 100$$

where OD<sub>control</sub> and OD<sub>sample</sub> indicated the optical density of the negative control and the tested compounds, respectively. All experiments were carried out in triplicate and on at least two separate occasions.

#### *Treatment of C2C12 and EA.hy926 cells*

C2C12 and EA.hy926 cells were seeded in culture flasks and incubated for 24 h. Then, the medium was removed and replaced with serum-free medium containing the grape extract at noncytotoxic concentrations (2.5–10 µg/mL for C2C12 and 0.068–0.250 µg/mL for EA.hy926 cells), followed by incubation for 24 h.

For studying the protective effect of the grape extract against tBHP-induced oxidative stress, the grape extract was removed after 24 h cell treatment with grape extract and replaced with medium containing tBHP (0.3 mM) followed by 30-min incubation.

For assessing the oxidative stress markers glutathione (GSH), ROS, TBA reactive substances (TBARS), and protein carbonyl levels in cells either in grape extract alone or in cotreatment with tBHP, the cells were trypsinized, collected, and centrifuged twice at 300g for 10 min at 5°C. After each centrifugation, the supernatant fluid was discarded and the cellular pellet was resuspended in PBS. After the second centrifugation, the supernatant fluid was used for measuring the oxidative stress markers.

#### *Flow cytometric analysis of GSH and ROS levels*

The intracellular GSH and ROS levels were assessed using mercury orange and DCF-DA, respectively. In particular, the fluorescent mercury orange binds directly to GSH, while DCF-DA within cells is deacetylated by esterases and further converted to fluorescent DCF by oxidative action of ROS. A 400-µM stock solution of mercury orange was made up in acetone and stored at 4°C, while a fresh 400 µM stock solution of DCF-DA was prepared in methanol. To assess the GSH and ROS levels, the cells were

resuspended in PBS at  $1 \times 10^6$  cells/mL and incubated in the presence of mercury orange (40 µM) or DCF-DA (10 µM) in the dark at 37°C for 30 min. Then, the cells were washed, resuspended in PBS, and submitted to flow cytometric analysis using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) with excitation and emission wavelengths at 488 and 530 nm for ROS and at 488 and 580 nm for GSH, respectively. Also, forward angle and right angle light scattering showing the cell size and cell internal complexity, respectively, were measured. Cells were analyzed at a flow rate of 1000 events/s. Analyses were performed on 10,000 cells per sample, and fluorescence intensities were measured on a logarithmic scale of four decades of log of fluorescence. Data were analyzed using BD Cell Quest software (Becton Dickinson). Each experiment was repeated at least three times.

#### *Assessment of TBARS levels by spectrophotometry*

For TBARS determination, a slightly modified assay of Keles et al.<sup>27</sup> was used. Cellular suspension (400 µL) or 400 µL of PBS for the blank were mixed with 500 µL of 35% TCA and 500 µL of Tris-hydrochloride (Tris-HCl; 200 mM, pH 7.4) and incubated for 10 min at room temperature. Afterward, 1 mL of 2 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 55 mM TBA solution were added, and the samples were incubated at 95°C for 45 min. The samples were cooled on ice for 5 min and after adding 1 mL of 70% TCA, the samples were mixed on a vortex. Then, the samples were centrifuged at 15,000g for 3 min, and the absorbance of the supernatant fraction was read at 530 nm. The assay requires >30 µg absolute amount of protein in the test sample. Total plasma protein was evaluated using Bradford assay. Calculation of TBARS concentration was based on the molar extinction coefficient of malondialdehyde. Each experiment was repeated at least three times.

#### *Assessment of protein carbonyl levels by spectrophotometry*

Protein carbonyl determination was based on the method of Patsoukis et al.<sup>28</sup> In this assay, cells were trypsinized, washed with PBS, and then lysed by sonication. Then, 200 µL of 20% TCA were added to 200 µL of cell lysate, and this mixture was incubated in an ice bath for 15 min and centrifuged at 15,000g



for 5 min at 4°C. The supernatant fraction was discarded. Also, 500 µL of 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH; in 2.5 N HCl) for the sample or 500 µL of 2.5 N HCl for the blank were added to the pellet. The samples were incubated in the dark at room temperature for 1 h, with intermittent mixing every 15 min and were centrifuged at 15,000g for 5 min at 4°C. The supernatant fraction was discarded, and 1 mL of 10% TCA was added to the pellet which was mixed and centrifuged at 15,000g for 5 min at 4°C. The supernatant fraction was discarded and 1 mL of ethanol-ethyl acetate (1:1 v/v) was added, vortexed, and centrifuged at 15,000g for 5 min at 4°C. This washing step was repeated twice. The supernatant fraction was discarded, and 1 mL of 5 M urea (pH 2.3) was added, vortexed, and incubated at 37°C for 15 min. The samples were centrifuged at 15,000g for 3 min at 4°C, and the absorbance was read at 375 nm. Calculation of protein carbonyl concentration was based on the molar extinction coefficient of DNPH. The assay requires >30 µg absolute amount of protein in the test sample. Total plasma protein was evaluated using Bradford assay. Each experiment was repeated at least three times.

### Statistical analysis

Data were analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's test for multiple pairwise comparisons. The level of statistical significance was set at  $p < 0.05$ . For all statistical analyses, Statistical Package for Social Sciences, version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) was used. Data are presented as mean  $\pm$  SEM.

## Results

### Polyphenolic composition of the grape pomace extract

The polyphenolic composition of the extract identified by liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry (LC-HRMS) method in positive and negative mode has been reported previously, and it is also presented herein (Table 1) for reader's convenience.<sup>26</sup> Thus, the extract is composed of the flavan-3-ols, catechin, and epicatechin, traced at  $R_t = 3.83$  min and  $R_t = 5.93$  min respectively, and detected in positive and negative mode based on their pseudomolecular ions  $[M+H]^+$  at mass to charge ratio ( $m/z$ ) 291.0863 and  $[M-H]^-$  at  $m/z$  289.0707, respectively.<sup>26</sup> Moreover, the flavan-3-ol epicatechin-3-gallate was identified at

**Table 1.** Polyphenolic composition identified by an LC-HRMS method and TPC of the grape extract.

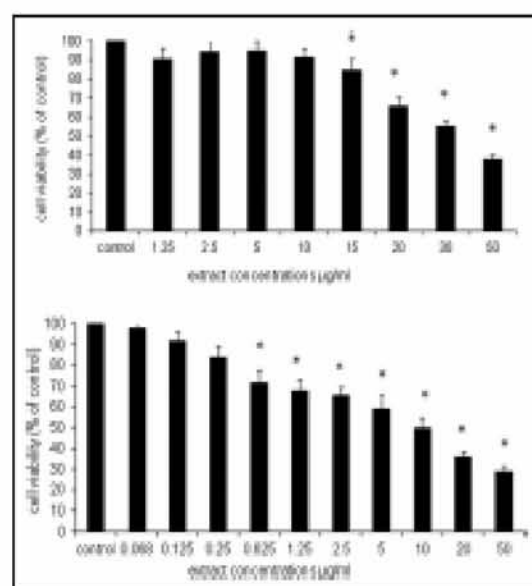
Polyphenols	$R_t$ (min) <sup>a</sup>	$m/z$ $[M \pm H]^{\pm a}$
Flavan-3-ols		
Catechin	3.83	291.0863 $[M+H]^+$ 289.0707 $[M-H]^-$
Epicatechin	5.93	291.0863 $[M+H]^+$ 289.0707 $[M-H]^-$
Epicatechin-3-gallate	9.25	441.0816 $[M-H]^-$
Anthocyanidins		
Cyanidin	9.25	609.1467 $[M-H]^-$
Malvidin	11.74	331.0812 $[M+H]^+$
Delphinidin	13.55	301.0359 $[M-H]^-$
Petunidin	15.99	315.0516 $[M-H]^-$
Anthocyanins		
Myrtillin	9.53	463.0888 $[M-H]^-$
Kuromanin	10.63	447.0939 $[M-H]^-$
Oenin	6.72	491.1201 $[M-H]^-$
Peonidin-3-O-glucoside	5.76	463.1235 $[M+H]^+$
Phenolic acids		
Gallic acid	0.78	169.0147 $[M-H]^-$
Caffaric acid	26.18	311.0398 $[M-H]^-$
Flavonols		
Quercetin	9.56	301.0357 $[M-H]^-$
Kaempferol	15.79	285.0407 $[M-H]^-$
TPC (mg gallic acid/g extract)		648

LC-HRMS: liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry; TPC: total polyphenolic content;  $m/z$ : mass to charge ratio.

<sup>a</sup>These data were first published in the study by Veskošć et al.<sup>26</sup>

$R_t = 9.25$  min based on its pseudomolecular ion  $[M-H]^-$  at  $m/z$  441.0816.<sup>26</sup> In addition, the anthocyanidins cyanidin, malvidin, delphinidin, and petunidin were detected at 9.25, 11.74, 13.55, and 15.99 min based on their corresponding pseudomolecular ions  $[M-H]^-$  at  $m/z$  609.1467,  $[M+H]^+$  at  $m/z$  331.0812,  $[M-H]^-$  at  $m/z$  301.0359, and  $[M-H]^-$  at  $m/z$  315.0516, respectively.<sup>26</sup> Furthermore, the anthocyanins, myrtillin, kuromanin, oenin, and peonidin-3-O-glucoside were detected at 9.53, 10.63, 6.72, and 5.76 min based on their corresponding pseudomolecular ions  $[M-H]^-$  at  $m/z$  463.0888,  $[M-H]^-$  at  $m/z$  447.0939,  $[M-H]^-$  at  $m/z$  491.1201, and  $[M+H]^+$  at  $m/z$  463.1235, respectively.<sup>26</sup> The flavonols, quercetin at  $R_t = 9.56$  min and kaempferol at  $R_t = 15.79$  min were also detected based on their pseudomolecular ions  $[M-H]^-$  at  $m/z$  301.0357 and  $[M-H]^-$  at  $m/z$  285.0407, respectively.<sup>26</sup> Apart from the above flavonoids, two phenolic acids, gallic acid ( $R_t = 0.78$  min) and caffaric acid ( $R_t = 26.18$  min), were also identified based on their pseudomolecular ions  $[M-H]^-$  at  $m/z$  169.0147 and  $[M-H]^-$  at  $m/z$  311.0398, respectively.<sup>26</sup> Finally, the total polyphenolic





**Figure 1.** Cell viability after treatment with the grape extract of (a) C2C12 cells and (b) EA.hy926 cells. The results represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments carried out in triplicate. \* $p < 0.05$ : significantly different from the control value.

content of the extract was evaluated and found to be 648 mg of gallic acid/g of extract.<sup>26</sup>

#### Effects of grape extract on viability of C2C12 and EA.hy926 cells

The XTT assay was used to assess the effects of grape extract on the viability of C2C12 and EA.hy926 cells. The results showed that the extract at concentrations  $>10$   $\mu\text{g/mL}$  significantly reduces viability of C2C12 cells (Figure 1(a)). Thus, the extract concentrations selected for the study were 2.5, 5, and 10  $\mu\text{g/mL}$ , which were not cytotoxic. In EA.hy926 cells, the extract exhibited cytotoxicity at lower concentrations compared with C2C12 cells (Figure 1(b)). Specifically, cytotoxic activity occurred at concentrations  $>0.675$   $\mu\text{g/mL}$  (Figure 1(b)). Therefore, for the EA.hy926 cells, the extract concentrations were 0.068, 0.125, and 0.250  $\mu\text{g/mL}$ .

#### Effects of grape extract treatment on oxidative stress markers in C2C12 cells

Oxidative stress was assessed by flow cytometry using DCF-DA and mercury orange for ROS and GSH, respectively, and spectrophotometrically for TBARS and protein carbonyls. Histograms demonstrating the

cell counts versus fluorescence of DCF-DA or mercury orange are shown in Figure 2(a) and (b), respectively. The mean fluorescence intensity values were evaluated using the BD Cell Quest software and are expressed as percentage of the control (untreated cells) (Figure 2(c)). Treatment of C2C12 cells with the grape extract alone at concentrations of 5 and 10  $\mu\text{g/mL}$  reduced ROS levels statistically significantly by  $28.80 \pm 10.8\%$  and  $47.60 \pm 8.5\%$ , respectively, compared with the control cell cultures (Figure 2(c)). Moreover, the flow cytometry analysis showed that the extract treatment increased GSH levels by  $151 \pm 28.3\%$ ,  $119 \pm 27.2\%$ , and  $168 \pm 33.7\%$  at 2.5, 5, and 10  $\mu\text{g/mL}$ , respectively (Figure 2(c)).

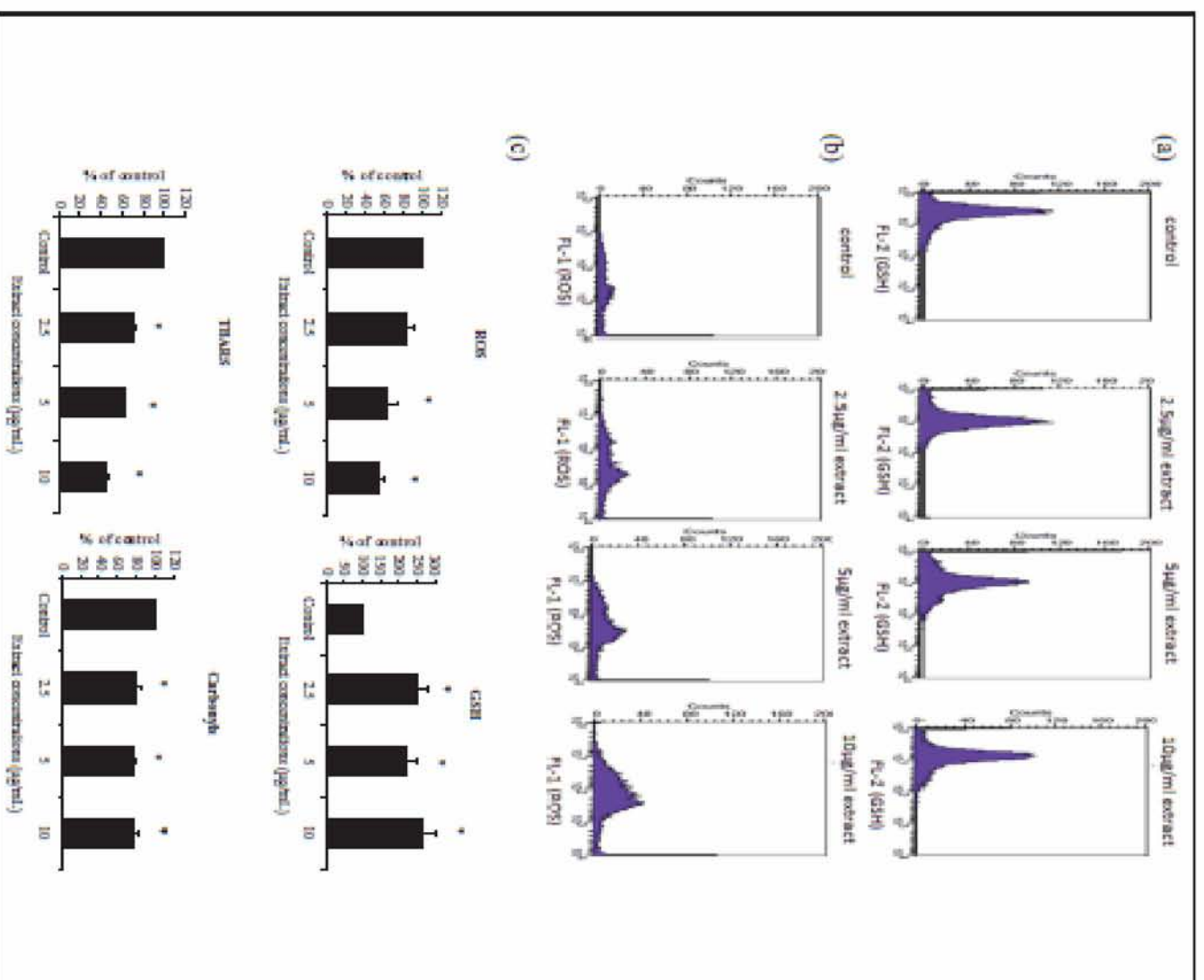
Like ROS levels, grape extract treatment reduced significantly TBARS levels by  $29.30 \pm 1.6\%$ ,  $37.60 \pm 1.7\%$ , and  $54.07 \pm 2.2\%$  at 2.5, 5, and 10  $\mu\text{g/mL}$ , respectively (Figure 2(c)). Furthermore, the grape extract treatment exhibited a significant reduction in protein carbonyl levels by  $20.00 \pm 5\%$ ,  $24.60 \pm 4.3\%$ , and  $21.80 \pm 3.9\%$  at 2.5, 5, and 10  $\mu\text{g/mL}$ , respectively (Figure 2(c)).

#### Effects of grape extract treatment on oxidative stress markers in EA.hy926 cells

The histograms demonstrating the cell counts versus fluorescence of DCF-DA or mercury orange in EA.hy926 cells after grape extract treatment are shown in Figure 3(a) and (b), respectively. The results from the flow cytometry analysis showed that grape extract treatment increased significantly GSH levels by about  $15.00 \pm 2\%$  at both 0.068 and 0.125  $\mu\text{g/mL}$  concentrations (Figure 3(c)). Moreover, the grape extract demonstrated a significant decrease in protein carbonyl levels by  $16.80 \pm 4.2\%$ ,  $11.70 \pm 1.3\%$ , and  $16.00 \pm 4.5\%$  at concentrations of 0.068, 0.125, and 0.250  $\mu\text{g/mL}$  (Figure 3(c)). However, the ROS and TBARS levels were not affected by the extract treatment at any concentration (Figure 3(c)).

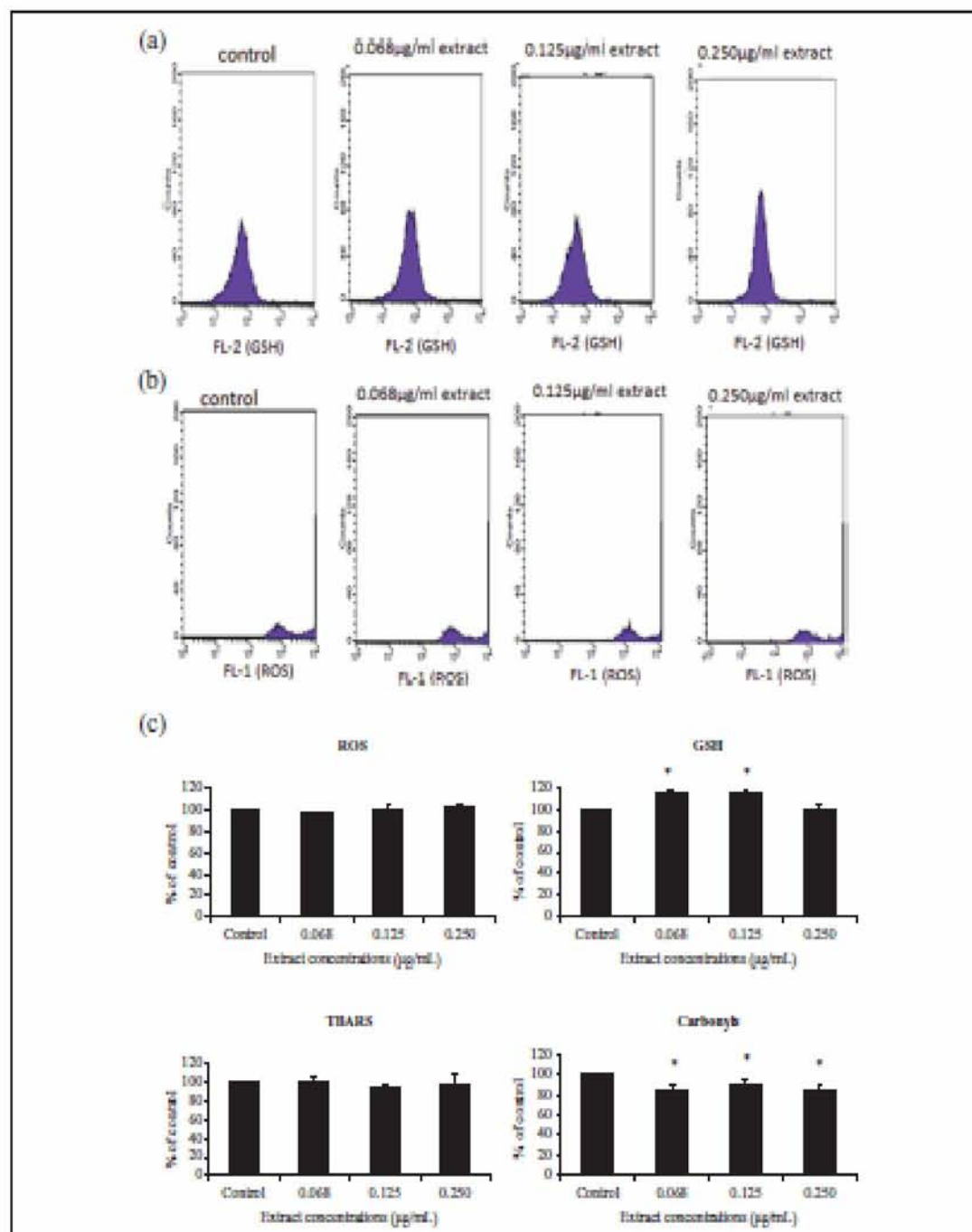
#### Protective effects of grape extract on tBHP-induced oxidative stress in C2C12 cells

The histograms from flow cytometry demonstrating the cell counts versus fluorescence of DCF-DA or mercury orange used for the staining of ROS and GSH, respectively, in C2C12 cells after cotreatment with grape extract and tBHP are shown in Figure 4(a) and (b), respectively. Regarding the ROS levels, tBHP treatment had no effect compared with the untreated cells. This

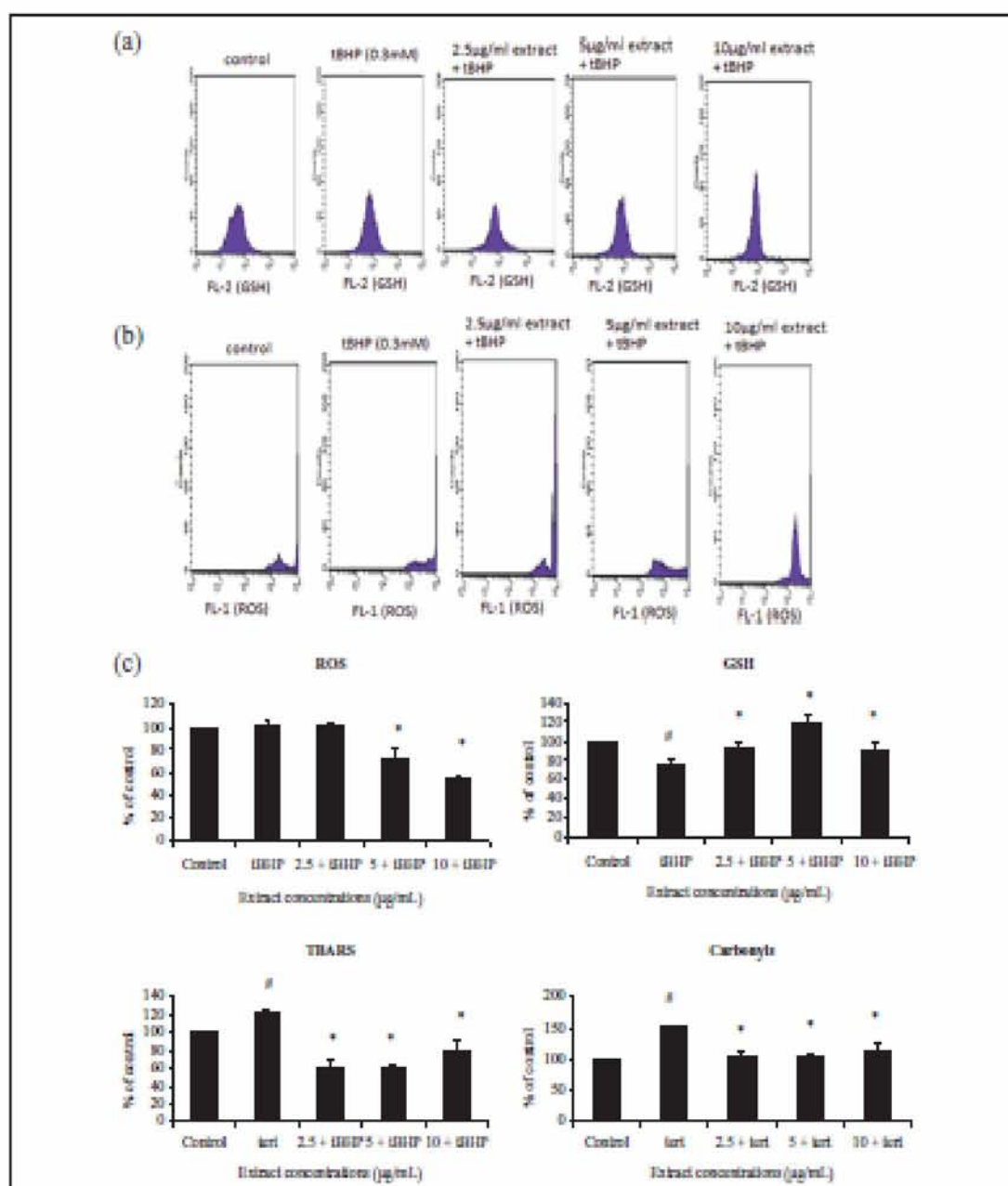


**Figure 2.** Effects of the grape extract treatment for 24 h on the oxidative stress markers in C2C12 cells. (a) The histogram of cell counts versus fluorescence of 10,000 cells analyzed using flow cytometer for the detection of GSH. FL2 represents the detection of fluorescence using 488 and 580 nm as the excitation and emission wavelengths, respectively. (b) The histograms show the cell counts versus fluorescence of 10,000 cells analyzed using flow cytometer for the detection of ROS. FL1 represents the detection of fluorescence using 488 and 530 nm as the excitation and emission wavelengths, respectively. For ROS and GSH measurement, C2C12 cells were incubated with 10 µM DCF-DA and 40 µM mercury orange, respectively, for 30 min at 37°C. The cells were then washed, suspended in PBS, and analyzed using flow cytometry, as described in materials and methods section. (c) Effects on ROS, GSH, TBARS, and protein carbonyl levels are shown. TBARS and protein carbonyl levels were assessed by spectrophotometer. All values are represented as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*p < 0.05; statistically significant compared with the control. GSH: glutathione; ROS: reactive oxygen species; DCF-DA: 2,2'-dichlorofluorescein diacetate; PBS: phosphate-buffered saline; TBARS: thiobarbituric reactive substances.





**Figure 3.** Effects of grape extract treatment for 24 h on the oxidative stress markers in EA.hy926 cells. (a) The histogram of cell counts versus fluorescence of 10,000 cells analyzed using a flow cytometer for the detection of GSH. FL2 represents the detection of fluorescence using 488 and 580 nm as the excitation and emission wavelengths, respectively. (b) The histograms show the cell counts versus fluorescence of 10,000 cells analyzed using a flow cytometer for the detection of ROS. FL1 represents the detection of fluorescence using 488 and 530 nm as the excitation and emission wavelengths, respectively. For ROS and GSH measurement, EA.hy926 cells were incubated with 10 µM DCF-DA and 40 µM mercury orange, respectively, for 30 min at 37°C. The cells were then washed, suspended in PBS, and analyzed by flow cytometry, as described in materials and methods section. (c) Effects on ROS, GSH, TBARS, and protein carbonyl levels are shown. TBARS and protein levels were assessed by spectrophotometer. All values are presented as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*p < 0.05: statistically significant compared with the control. GSH: glutathione; ROS: reactive oxygen species; DCF-DA: 2,2-dichlorofluorescein diacetate; PBS: phosphate-buffered saline; TBARS: thiobarbituric reactive substances.



**Figure 4.** Effects of grape extract alone or with tBHP treatment on the oxidative stress markers in C2C12 cells. Cells were studied under three conditions: under normal conditions (control), under treatment with tBHP (0.3 mM) for 30 min, and under the combination of grape extract (2.5–10 µg/mL) for 24 h and tBHP (0.3 mM) for 30 min. (a) The histogram of cell counts versus fluorescence of 10,000 cells analyzed using a flow cytometer for the detection of GSH. FL2 represents the detection of fluorescence using 488 and 580 nm as the excitation and emission wavelengths, respectively. (b) The histograms show the cell counts versus fluorescence of 10,000 cells analyzed using a flow cytometer for the detection of ROS. FL1 represents the detection of fluorescence using 488 and 530 nm as the excitation and emission wavelengths, respectively. For ROS and GSH measurement, C2C12 cells were incubated with 10 µM DCF-DA and 40 µM mercury orange respectively for 30 min at 37°C. The cells were then washed, suspended in PBS, and analyzed by flow cytometry, as described in materials and methods section. (c) Effects on ROS, GSH, TBARS, and protein carbonyl levels are shown. TBARS and protein levels were assessed by spectrophotometer. All values are presented as the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $p < 0.05$ ; statistically significant compared with the control. tBHP: tert-butyl hydroperoxide; GSH: glutathione; ROS: reactive oxygen species; DCF-DA: 2,2-dichlorodifluorescein diacetate; PBS: phosphate-buffered saline; TBARS: thiobarbituric reactive substances.



may be due to neutralization of free radicals by the antioxidant mechanisms of the cell (e.g. GSH) and/or to reaction with other molecules. Thus, although tBHP produces free radicals, their "free form" was not observed. For example, we observed a decrease in GSH and an increase in TBARS (Figure 4(c)) after tBHP treatment, indicating that free radicals reacted with GSH and lipids. However, the results showed that treatment of C2C12 cells with the grape extract at concentrations of 5 and 10  $\mu\text{g/mL}$ , before tBHP administration, reduced significantly ROS levels by  $38.80 \pm 5\%$  and  $47.60 \pm 3\%$ , respectively, compared with tBHP alone treatment (Figure 4(c)). Moreover, flow cytometry analysis showed that the grape extract treatment increased GSH levels significantly by  $22.00 \pm 6.2\%$ ,  $54.00 \pm 8.1\%$ , and  $17.00 \pm 8.3\%$  at 2.5, 5, and 10  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, compared with tBHP treatment (Figure 4(c)).

With regard the effects on lipid peroxidation, grape extracts inhibited significantly tBHP-induced increase in TBARS levels by  $51.00 \pm 12.3\%$ ,  $52.40 \pm 10.4\%$ , and  $36.70 \pm 16.7\%$  at 2.5, 5, and 10  $\mu\text{g/mL}$ , respectively (Figure 4(c)). Finally, the grape extract decreased tBHP-induced increases in protein carbonyls by  $32.00 \pm 8.1\%$ ,  $31.20 \pm 4.6\%$ , and  $24.90 \pm 8.4\%$  at 2.5, 5, and 10  $\mu\text{g/mL}$ , respectively (Figure 4(c)).

#### Effects of grape extract on tBHP-induced oxidative stress in EA.hy926 cells

The histograms showing the cell counts versus fluorescence of DCF-DA or mercury orange in C2C12 cells after cotreatment with grape extract and tBHP are shown in Figure 5(a) and (b), respectively. In contrast to C2C12 cells, the grape extract did not change ROS levels in EA.hy926 cells compared with the tBHP treatment (Figure 5(c)).

However, grape extracts inhibited significantly tBHP-induced decrease in GSH levels by  $14.3 \pm 4.6$ ,  $10.1 \pm 5.2$ , and  $15.4 \pm 3.4\%$  at 0.068, 0.125, and 0.250  $\mu\text{g/mL}$  (Figure 5(c)). Moreover, the grape extract significantly inhibited tBHP-induced increase in TBARS levels by  $23.3 \pm 3.1$ ,  $20.1 \pm 1.6$ , and  $17.7 \pm 3.4\%$  at 0.068, 0.125, and 0.250  $\mu\text{g/mL}$  (Figure 5(c)). Like TBARS levels, the grape extract significantly inhibited tBHP-induced increase in protein carbonyl levels by  $41.50 \pm 8.3\%$ ,  $26.2 \pm 4.6\%$ , and  $28.30 \pm 7.9\%$  at 0.068, 0.125, and 0.250  $\mu\text{g/mL}$ , respectively (Figure 5(c)).

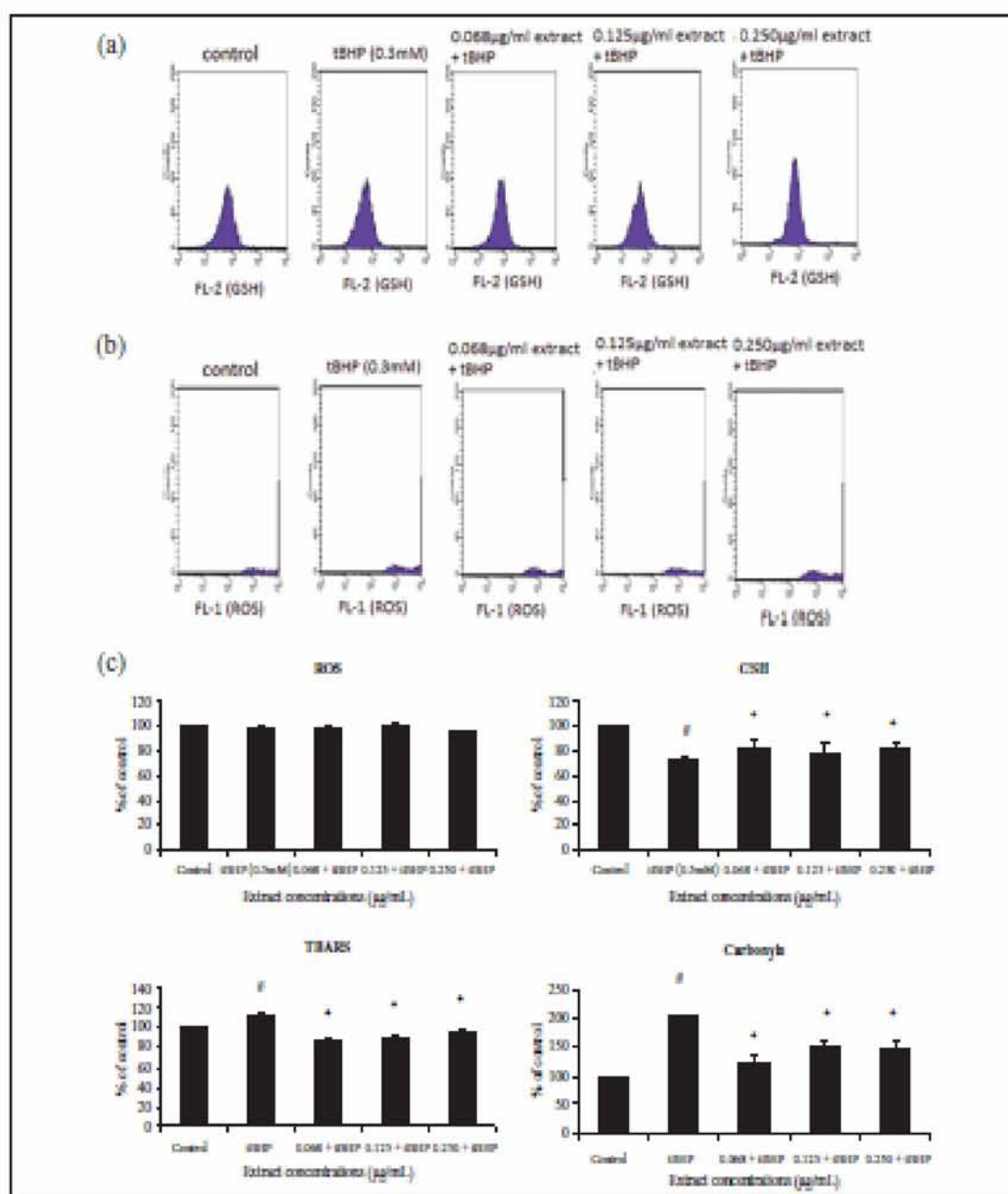
## Discussion

In the present study, we investigated the possible enhancement of the antioxidant mechanisms of a grape pomace extract rich in polyphenols in the absence or presence of an oxidative stress-induced agent on muscle and endothelial cells. The grape pomace extracts was isolated from the Greek *V. vinifera* variety of Batiki Tymavou. In a previous study, we have identified the polyphenolic composition of the extract and have shown in vitro that it possesses strong antioxidant activity.<sup>26</sup>

Our results showed that grape extract treatment without the presence of an oxidant stimulant in muscle cells enhanced their antioxidant status. Specifically, there was a dose-dependent decrease in total ROS levels within muscle cells. This finding was supported by the reduction in TBARS levels, a marker of lipid peroxidation. There was also a reduction in protein oxidation as indicated by the reduced protein carbonyl levels. Moreover, the grape extract induced an increase in GSH levels, one of the most important endogenous antioxidant molecules.<sup>29</sup> Therefore, the increase in GSH levels seems to be one of the molecular mechanisms accounting for the antioxidant activity enhancement by the grape extract in muscle cells.

Importantly, our results showed that the enhancement of the muscle cells' antioxidant status by the grape extract was efficient to protect from the adverse effects of the oxidative stress-induced agent tBHP. Thus, when tBHP was added to muscle C2C12 cells after grape extract treatment, there were significantly lowered ROS, TBARS, and protein carbonyl levels compared with tBHP alone treatment. In vivo studies have also shown that grape extract administration reduces oxidative stress in skeletal muscles. For example, grape extract administration decreased lipid peroxidation in skeletal muscle of rats.<sup>30</sup> Another in vivo study has also shown that grape seed extract administration increased the antioxidant enzyme activity in skeletal muscles of diabetic rats.<sup>31</sup> Moreover, the present results showed that GSH levels were significant higher in muscle cells treated with grape extract before tBHP administration, compared to cells treated with tBHP alone. Interestingly, the GSH levels in muscle cells treated with grape extract before tBHP administration were even significantly higher than those in untreated cells. This finding emphasizes the crucial role the increased GSH levels may play in the observed antioxidant activity of the grape extract in





**Figure 5.** Effects of grape extract along or with tBHP treatment on the oxidative stress markers in EA.hy926 cells. Cells were studied under three conditions: under normal conditions (control), under treatment with tBHP (0.3 mM) for 30 min, and under the combination of grape extract (0.068–0.250 µg/mL) for 24 h and tBHP (0.3 mM) for 30 min. (a) The histogram of cell counts versus fluorescence of 10,000 cells analyzed using a flow cytometer for the detection of GSH. FL2 represents the detection of fluorescence using 488 and 580 nm as the excitation and emission wavelengths, respectively. (b) The histograms show the cell counts versus fluorescence of 10,000 cells analyzed by the flow cytometer for the detection of ROS. FL1 represents the detection of fluorescence using 488 and 530 nm as the excitation and emission wavelengths, respectively. For ROS and GSH measurement, EA.hy926 cells were incubated with 10 µM DCF-DA and 40 µM mercury orange respectively for 30 min at 37°C. The cells were then washed, suspended in PBS, and analyzed by flow cytometry, as described in materials and methods section. (c) Effects on ROS, GSH, TBARS, and protein carbonyl levels are shown. TBARS and protein levels were assessed by spectrophotometer. All values are presented as the mean ± SEM of three independent experiments. \*p < 0.05: statistically significant compared with the control. tBHP: tert-butyl hydroperoxide; GSH: glutathione; ROS: reactive oxygen species; DCF-DA: 2,2-dichlorodifluorescein diacetate; PBS: phosphate-buffered saline; TBARS: thiobarbituric reactive substances.



muscle cells. Although several studies have shown that grape extracts protect from oxidative stress by increasing GSH in cardiac muscle and other tissues, this is the first report in skeletal muscle.<sup>32,33</sup>

In addition, we investigated the possible antioxidant effects of the grape extract both in the presence and in the absence of an oxidant agent (tBHP) on endothelial EA.hy926 cells. In endothelial EA.hy926 cells, grape extract treatment without an oxidative stress stimulant enhanced the antioxidant mechanisms. Although this was similar to what observed in muscle cells, there were differences. Thus, like in muscle cells, the grape extract reduced significantly protein carbonyl level compared with untreated cells, indicating a reduction in protein oxidation. Again that protective effect seems to be attributed to the significant grape extract-induced increase in GSH levels compared with the untreated cells. However, in EA.hy926 cells, unlike in muscle cells, the grape extract did not reduce significantly ROS and TBARS levels. This lower potency in endothelial cells may be due to the lower grape extract concentrations used in EA.hy926 cells compared with C2C12 cells.

Furthermore, in endothelial EA.hy926 cells, the grape extract treatment protected from tBHP-induced oxidative stress as occurred in muscle cells. In particular, EA.hy926 cell treated with grape extract significantly inhibited tBHP-induced increase in TBARS and protein carbonyl levels. Also, in EA.hy926 cells similar to muscle cells, the grape extract-induced increase in GSH levels may account, at least in part, for the reduction in tBHP-induced oxidative stress. However, the GSH increase induced by the grape extract in EA.hy926 cells was lower than that in C2C12 cells. This difference may be explained by the lower grape extract concentrations used in EA.hy926 cells compared to those in C2C12 cells. Moreover, the grape extract may enhance the antioxidant status through other mechanisms, apart from GSH increase, that may differ between the two cell lines. Interestingly, a clinical study has shown that grape seed extract increased GSH plasma levels in type 2 diabetic subjects at high cardiovascular risk.<sup>34</sup> Thus, the results may suggest the use of grape pomace extracts to prevent oxidative stress-induced damage to endothelial cells and consequently to cardiovascular system. Interestingly, studies have shown that grape extract administration exhibited protection from myocardial ischemia-reperfusion injury, alleviation of cardiovascular function, and protection against fibrillation and ventricular tachycardia.<sup>13</sup> Moreover, in other studies,

grape seed extract inhibited tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced DNA oxidation in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), while grape skin and seed extracts inhibited glucose-induced increase in ROS in endothelial progenitor cells.<sup>35,36</sup> Feng et al.<sup>37</sup> have also reported that, in HUVECs, grape skin extract inhibited hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )-induced increase in ROS via activating the PI3-kinase/AKT pathway.

The antioxidant activity of grape extract is attributed to a large extent to its high polyphenolic content. Thus, the polyphenolic composition of the grape extract was assessed and different classes of polyphenols as flavan-3-ols, flavonols, anthocyanidins, anthocyanins, and phenolic acids were identified. All these polyphenols identified in the grape extracts exhibit antioxidant activity.<sup>38,39</sup> In particular, the flavanols, catechin, and epicatechin have been found to be among flavonoids with the most powerful free radical scavenging activity. Their free radical scavenging activity is attributed mainly to their chemical structure, especially to the structure of both benzene rings, A-ring and B-ring.<sup>40</sup> The antioxidant activity of flavanols is further increased by the presence of the trihydroxyl structure in the D ring in epigallocatechin-3-gallate (EGCG).<sup>41</sup> Quercetin has an identical number of hydroxyl groups in the same positions as catechin but also contains the 2,3-double bond in the C ring and the 4-oxo function. This structure advantage confers an enhancement of the antioxidant activity compared with the saturated heterocyclic ring of catechin. Anthocyanins, especially cyanidin and delphinidin, have also been reported for their strong free radical scavenging activity in many *in vitro* studies.<sup>42</sup> It has also been reported that anthocyanidins, such as cyanidin with the central unsaturated anthocyanidin C ring, allowing conjugation, have approximately the same antioxidant activity as quercetin.<sup>43</sup> The major antioxidant activity of the anthocyanins can be ascribed again to the reducing power of the *o*-dihydroxy structure in the B ring as in cyanidin and quercetin.<sup>43</sup> Finally, the free radical scavenging activity of the polyphenolic acid gallic acid is attributed mainly to its three available hydroxyl groups.<sup>43</sup> Apart from the direct free radical scavenging activity, polyphenols exert their antioxidant effects through modulation of molecular mechanisms in cells. For example, the flavanol EGCG has been shown to reduce the cytotoxicity evoked by  $H_2O_2$  and increased the levels of the enzymes related to the oxidative stress, resulting in an enhanced cellular GSH content in HepG2 cells.<sup>44</sup> Moreover, quercetin protected human keratinocyte



HaCaT cells from ultra violet-induced oxidative stress through increased expression of antioxidant genes mediated by the transcription nuclear factor Nrf2.<sup>45</sup> Furthermore, the anthocyanidins, cyaniding and delphinidin, have been shown to prevent ROS formation in human aortic vascular smooth muscle cells through inhibition of mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) and c-Jun N-terminal kinase pathways.<sup>46</sup> Finally, gallic acid has been reported to protect rat pheochromocytoma PC12 cells from kainic acid-induced oxidative stress by reducing COX-2 and p38 MAPK levels.<sup>47</sup>

In conclusion, the present results indicate that the tested grape pomace extract can enhance the antioxidant mechanisms of muscle and endothelial cells both in the presence and in the absence of an oxidative stress-induced agent. These findings suggest that the grape pomace extract may be used as a food supplement to reduce the adverse effects caused by oxidative stress-induced conditions in these cells. It is also worthwhile to mention that in both cell lines the antioxidant activity of the grape extract was observed at low concentrations (0.068–2.5 µg/mL for EA.hy926 and 2.5–10 µg/mL for C2C12 cells), while, in many studies, higher concentrations are used that are not physiologically meaningful or present toxicity.

### Conflict of interest

The authors declared no conflicts of interest.

### Funding

This work was cofinanced by the MSc program "Biotechnology-Nutrition and Environment" in the Department of Biochemistry and Biotechnology at University of Thessaly, Greece.

### References

- Ji LL. Antioxidant signaling in skeletal muscle: a brief review. *Exp Gerontol* 2007; 42: 582–593.
- Wells PG, McCallum GP, Chen CS, et al. Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicol Sci* 2009; 108(1): 4–18.
- Ji LL, Gomez-Cabrera MC, and Vina J. Exercise and hormesis: activation of cellular antioxidant signaling pathway. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1067: 425–435.
- Gomez-Cabrera MC, Borrás C, Pallardó FV, et al. Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J Physiol* 2005; 567: 113–120.
- Baudet M, Daugareil C, and Ferrières J. Cardiovascular disease prevention and life style modifications. *Ann Cardiol Angeiol* 2012; 61(2): 93–98.
- Kelsen SG. Respiratory epithelial cell responses to cigarette smoke: the unfolded protein response. *Pulm Pharmacol Ther* 2012; 25(6): 447–452.
- Veskoukis AS, Nikolaidis MG, Kyparos A, et al. Effects of xanthine oxidase inhibition on oxidative stress and swimming performance in rats. *Appl Physiol Nutr Metab* 2008; 33(6): 1140–1154.
- Schneider BS and Tidus PM. Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: how do we resolve the controversy? *Sports Med* 2007; 37(10): 837–856.
- Nikolaidis MG, Puschalis V, Giakas G, et al. Decreased blood oxidative stress after repeated muscle-damaging exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2007; 39(7): 1080–1089.
- Bettors JL, Criswell DS, Shanely RA, et al. Trolox attenuates mechanical ventilation-induced diaphragmatic dysfunction and proteolysis. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 1179–1184.
- Karpińska A and Gromadzka G. Oxidative stress and natural antioxidant mechanisms: the role in neurodegeneration. From molecular mechanisms to therapeutic strategies. *Postepy Hig Med Dosw* 2013; 67: 43–53.
- Poljsak B and Milisav I. The neglected significance of "antioxidative stress". *Oxid Med Cell Longev* 2012; 2012: 480895.
- Phaneuf S and Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33(3): 393–396.
- McChung JM, Deruisseau KC, Whidden MA, et al. Overexpression of antioxidant enzymes in diaphragm muscle does not alter contraction-induced fatigue or recovery. *Exp Physiol* 2010; 95: 222–231.
- Bagchi D, Sen CK, Ray SD, et al. Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutation Res* 2003; 523–524: 87–97.
- Kokum S, Wolf RE, Yoshikawa T, et al. Molecular mechanisms of neutrophil-endothelial cell adhesion induced by redox imbalance. *Circ Res* 1999; 84: 516–524.
- Hazel T and Müller T. Culture of neuroepithelial stem cells. *Curr Protoc Neurosci*. 2001; Chapter 3: Unit 3.1.
- Kerasioti E, Kiskini A, Veskoukis A, et al. Effect of a special carbohydrate-protein cake on oxidative stress markers after exhaustive cycling in humans. *Food Chem Toxicol* 2012; 50: 2805–2810.
- Georgakouli K, Deli CK, Zalavras A, et al. α-Lipoic acid supplementation up-regulates antioxidant capacity in adults with G6PD deficiency. *Food Chem Toxicol* 2013; 61: 69–73.

AQ2



20. Liu RH. Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet. *Adv Nutr* 2013; 4(3): 384S–392S.
21. Stagos D, Kazantzoglou G, Magiatis P, et al. Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* on Mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA. *Int J Mol Med* 2005; 15(6): 1013–1022.
22. Stagos D, Kazantzoglou G, Theofanidou D, et al. Activity of grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* against mutagenicity induced by bleomycin and hydrogen peroxide in *Salmonella typhimurium* strain TA102. *Mutat Res* 2006; 609(2): 165–175.
23. Stagos D, Spanou C, Margariti M, et al. Cytogenetic effects of grape extracts (*Vitis vinifera*) and polyphenols on mitomycin C-induced sister chromatid exchanges (SCEs) in human blood lymphocytes. *J Agric Food Chem* 2007; 55(13): 5246–5252.
24. Apostolou A, Stagos D, Galitsiou E, et al. Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. *Food Chem* 2013; 61:60–68.
25. Soleas GJ, Diamandis EP, and Goldberg DM. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal* 1997; 11(5): 287–313.
26. Venkoukis AS, Kyparos A, Nikolaidis MG, et al. The antioxidant effects of a polyphenol-rich grape pomace extract in vitro do not correspond in vivo using exercise as an oxidant stimulus. *Oxid Med Cell Longev* 2012; 2012: 185867.
27. Kales MS, Taysi S, Sen N, et al. Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can Neurol J Sci* 2001; 28: 141–143.
28. Patrakis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, et al. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett* 2004; 357: 83–86.
29. Quintana-Cabrera R and Bolanos JP. Glutathione and  $\gamma$ -glutamylcysteine in the antioxidant and survival functions of mitochondria. *Biochem Soc Trans* 2013; 41(1): 106–110.
30. Pajuelo D, Quesada H, Diaz S, et al. Chronic dietary supplementation of proanthocyanidins corrects the mitochondrial dysfunction of brown adipose tissue caused by diet-induced obesity in Wistar rats. *Br J Nutr* 2012; 107(2): 170–178.
31. Ding Y, Dai X, Jiang Y, et al. Grape seed proanthocyanidin extracts alleviate oxidative stress and ER stress in skeletal muscle of low-dose streptozotocin- and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats. *Mol Nutr Food Res* 2013; 57(2): 365–369.
32. Orhan N, Aslan M, Orhan DD, et al. In-vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (*Vitis vinifera*) in diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2006; 108(2): 280–286.
33. Filip A, Daicovicu D, Clichici S, et al. The effects of grape seeds polyphenols on SKH-1 mice skin irradiated with multiple doses of UV-B. *J Photochem Photobiol B* 2011; 105(2): 133–142.
34. Kar P, Laight D, Rooprai HK, et al. Effects of grape seed extract in type 2 diabetic subjects at high cardiovascular risk: a double blind randomized placebo controlled trial examining metabolic markers, vascular tone, inflammation, oxidative stress and insulin sensitivity. *Diabet Med* 2009; 26(5): 526–531.
35. Chao CL, Chang NC, Weng CS, et al. Grape seed extract ameliorates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced inflammatory status of human umbilical vein endothelial cells. *Eur J Nutr* 2011; 50(6): 401–419.
36. Felice F, Zambito Y, Di Colo G, et al. Red grape skin and seeds polyphenols: Evidence of their protective effects on endothelial progenitor cells and improvement of their intestinal absorption. *Eur J Pharm Biopharm* 2012; 80(1): 176–184.
37. Feng Z, Wei RB, Hong Q, et al. Grape seed extract enhances eNOS expression and NO production through regulating calcium-mediated AKT phosphorylation in  $H_2O_2$ -treated endothelium. *Cell Biol Int* 2010; 34(10): 1055–1061.
38. Hosu A, Cristea VM, and Cimpoiu C. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. *Food Chem* 2013; 150: 113–118.
39. Hribar U and Ulrich NP. The metabolism of anthocyanins. *Curr Drug Metab* 2014; 15(1): 3–13.
40. Sang S, Tian S, Wang H, et al. Chemical studies of the antioxidant mechanism of tea catechins: radical reaction products of epicatechin with peroxyl radicals. *Bioorg Med Chem* 2003; 11(16): 3371–3378.
41. Singh BN, Shankar S, and Srivastava RK. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 2011; 82(12): 1807–1821.
42. Kahkonen MP and Heinonen M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. *J Agric Food Chem* 2003; 51: 628–633.
43. Rice-Evans CA, Miller NJ, and Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and

- phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20(7): 933-956.
44. Murakami C, Hirakawa Y, Inui H, et al. Effect of tea catechins on cellular lipid peroxidation and cytotoxicity in HepG2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002; 66: 1559-1562.
45. Kimun S, Warabi E, Yanagawa T, et al. Essential role of Nrf2 in keratinocyte protection from UVA by quercetin. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 387(1): 109-114.
46. Oak MH, Bedoui JE, Madeim SV, et al. Delphinidin and cyanidin inhibit PDGF(AB)-induced VEGF release in vascular smooth muscle cells by preventing activation of p38 MAPK and JNK. *Br J Pharmacol* 2006; 149(3): 283-290.
47. Huang HL, Lin CC, Jeng KC, et al. Fresh green tea and gallic acid ameliorate oxidative stress in kainic acid-induced status epilepticus. *J Agric Food Chem* 2012; 60(9): 2328-2336.



## Grape pomace extract exerts antioxidant effects through an increase in GCS levels and GST activity in muscle and endothelial cells

NIKOLAOS GOUTZOURELAS<sup>1</sup>, DIMITRIOS STAGOS<sup>1</sup>, ANASTASIA HOUSMEKERIDOU<sup>1</sup>,  
CHRISTINA KARAPOULIOU<sup>1</sup>, EFTHALIA KERASIOU<sup>1</sup>, NEKTARIOS ALIGIANIS<sup>2</sup>,  
ALEXIOS L. SKALTSOUNIS<sup>2</sup>, DEMETRIOS A. SPANDIDOS<sup>3</sup>,  
ARISTIDIS M. TSATSAKIS<sup>4</sup> and DEMETRIOS KOURETAS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa 41221;

<sup>2</sup>Division of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry, School of Pharmacy, University of Athens,

Athens 15771; <sup>3</sup>Laboratory of Clinical Virology, University of Crete, Medical School, Heraklion 71409;

<sup>4</sup>Department of Forensic Sciences and Toxicology, Medical School, University of Crete, Heraklion 71003, Greece

Received May 25, 2015; Accepted June 15, 2015

DOI: 10.3892/ijmm.2015.2246

**Abstract.** In a previous study, we demonstrated that a grape pomace extract (GPE) exerted antioxidant activity in endothelial (EA.hy926) and muscle (C2C12) cells through an increase in glutathione (GSH) levels. In the present study, in order to elucidate the mechanisms responsible for the antioxidant activity of GPE, its effects on the expression of critical antioxidant enzymes, such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), heme oxygenase 1 (HO-1) and gamma-glutamylcysteine synthetase (GCS) were assessed in EA.hy926 and C2C12 cells. Moreover, the effects of GPE on CAT, SOD and glutathione S-transferase (GST) enzymatic activity were evaluated. For this purpose, the C2C12 and EA.hy926 cells were treated with GPE at low and non-cytotoxic concentrations (2.5 and 10 µg/ml for the C2C12 cells; 0.068 and 0.250 µg/ml

for the EA.hy926 cells) for 3, 6, 12, 18 and 24 h. Following incubation, enzymatic expression and activity were assessed. The results revealed that treatment with GPE significantly increased GCS levels and GST activity in both the C2C12 and EA.hy926 cells. However, GPE significantly decreased CAT levels and activity, but only in the muscle cells, while it had no effect on CAT levels and activity in the endothelial cells. Moreover, treatment with GPE had no effect on HO-1 and SOD expression and activity in both cell lines. Therefore, the present results provide further evidence of the crucial role of GSH systems in the antioxidant effects exerted by GPE. Thus, GPE may prove to be effective for use as a food supplement for the treatment of oxidative stress-induced pathological conditions of the cardiovascular and skeletal muscle systems, particularly those associated with low GSH levels.

### Introduction

Free radicals are produced in living organisms during normal metabolism (e.g., the reactions of mitochondrial respiratory chain and cytochrome P450), inflammation, phagocytosis and other physiological processes (1,2). The most important category of free radicals is constituted by reactive oxygen species (ROS), such as superoxide radical anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydroxyl radical ( $OH^{\cdot}$ ), peroxyl radical ( $RO_2^{\cdot}$ ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) (2). An amount of ROS is necessary for a number of functions of an organism, including phagocytosis (3), intracellular signaling (2), cell proliferation, and apoptosis (4). However, the excessive production of ROS may lead to oxidative stress, a pathophysiological condition which has been implicated in the oxidative damage of macromolecules (lipids, protein and DNA) (2,5), immune dysfunction (6), muscle damage (7) and fatigue (8).

Oxidative stress occurs frequently in muscle tissue exposed to ROS production. For example, during intense exercise there is a high rate of  $O_2$  consumption in skeletal muscle that may cause incomplete  $O_2$  reduction and electron leakage from the electron

**Correspondence to:** Professor Demetrios Kouretas, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Ploutonos 26 and Aiolou St., Larissa 41221, Greece  
E-mail: dkouret@uth.gr

**Abbreviations:** GPE, grape pomace extract; GSH, glutathione; CAT, catalase; SOD, superoxide dismutase; HO-1, heme oxygenase 1; GCS, gamma-glutamylcysteine synthetase; GST, glutathione S-transferase; ROS, reactive oxygen species; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase;  $H_2O_2$ , hydrogen peroxide;  $O_2^{\cdot-}$ , superoxide radical anion;  $OH^{\cdot}$ , hydroxyl radical;  $RO_2^{\cdot}$ , peroxyl radical; CDNB, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene; NBT, nitroblue tetrazolium salt; DETAPAC, diethylenetriaminepentaacetic acid; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; RIPA buffer, radio-immunoprecipitation buffer; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid

**Key words:** grape pomace extract, oxidative stress, muscle cells, endothelial cells, glutathione, antioxidants



transfer chain, as well as the extra-mitochondrial production of ROS, leading to the generation of ROS and oxidative stress. These effects in turn result in muscle fatigue and cell damage and apoptosis (9,10).

Moreover, oxidative stress-induced damage of the vascular endothelium may lead to the development of various diseases (11). A redox imbalance in endothelial cells results in the surface expression of different endothelial cell adhesion molecules, suggesting that oxidative stress induces acute and chronic phases of leukocyte adhesion to the endothelium (12,13). It has also been shown that the interaction between ROS and nitric oxide (NO) sets off a vicious circle, which results in further endothelial activation and inflammation (11). Furthermore, ROS, such as  $H_2O_2$ , can diffuse throughout endothelial cells and react with cysteine groups in proteins to modify their function (14). Thus, under conditions of oxidative stress, endothelial cells can lose integrity, progress to senescence and detach into the circulation (15).

However, every living organism has antioxidant mechanisms, including both enzymatic and non-enzymatic with which to counteract the overproduction of free radicals (2). Moreover, we have previously demonstrated that the supplementation of antioxidants through diet may be used to reduce the detrimental effects of oxidative stress on human health (16-18). Some of the most well known food sources of antioxidants are grapes and wine (19). Our research group has conducted several studies on the antioxidant properties of grapes which are attributed mainly to their polyphenolic content (20-24). In another previous study of ours, we demonstrated that a grape pomace extract (GPE) rich in polyphenols derived from pomace, a by-product of the wine-making process consisting of peels, seeds and stems, reduced oxidative stress in muscle and endothelial cells mainly through an increase in glutathione (GSH) levels (25). Thus, in the present study, the effects of GPE on enzymes which are crucial for GSH metabolism, such as gamma-glutamylcysteine synthetase (GCS) and glutathione S-transferase (GST) were investigated in endothelial and muscle cells. Moreover, the effects of GPE on other critical antioxidant enzymes, such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and heme oxygenase 1 (HO-1) were examined in endothelial and muscle cells. The investigation of the effects of GPE on antioxidant enzymes at the cellular level may help to elucidate the molecular mechanisms through which it exerts its antioxidant effects. The understanding of these mechanisms provides valuable knowledge which may aid in the preparation of plant extracts aimed to be used as food supplements.

## Materials and methods

**Extract preparation.** The grape extract examined was obtained from Batiaki Tyrnavou variety (a red grape variety grown in Central Greece) of the *Vitis vinifera* species. The isolation of the extract was carried out as previously described (26). In brief, the raw material was dried in a steady, well-ventilated environment and extracted using ethanol (96%) at 50°C for 4 h. Following filtration, the solvent was evaporated under reduced pressure, and the residue (i.e., GPE) was kept at -20°C until further use.

The polyphenolic composition of the extract identified by a liquid chromatography/high resolution mass spectrometry (LC-HRMS) method in positive and negative mode has been reported previously (26). Thus, the extract was composed

of flavan-3-ols (catechin and epicatechin), anthocyanidins, (cyanidin, malvidin, delphinidin and petunidin), anthocyanins (myricetin, kuromarin, cinn and peonidin-3-O-glucoside) and flavonols (quercetin), phenolic acids (gallic acid and caffeic acid). Moreover, the total polyphenolic content (TPC) of the extract was evaluated and found equal to 648 mg of gallic acid per g of extract (26).

**Cell culture conditions.** The C2C12 muscle cells were a gift from Professor Koutsilieris (National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece) and the EA.hy926 cells were from Professor Kouloulis (University of Thessaly, Larissa, Greece). All the cells were cultured in normal Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), containing 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 U/ml of penicillin and 100 U/ml of streptomycin (all from Gibco, Paisley, UK) in plastic disposable tissue culture flasks at 37°C in 5% carbon dioxide.

**Treatment of the cells with GPE.** The C2C12 and EA.hy926 cells were seeded in culture flasks and incubated for 24 h. The medium was then removed and replaced with serum-free medium containing GPE at non-cytotoxic concentrations (2.5 and 10 µg/ml for the C2C12 cells and 0.068 and 0.025 µg/ml for the EA.hy926 cells) followed by incubation for 3, 6, 12, 18 and 24 h. In a previous study of ours, it was shown that these concentrations were non-cytotoxic to the C2C12 and EA.hy926 cells (25). Untreated cells were used as controls.

Following treatment, the cells were lysed in radio-immunoprecipitation buffer (RIPA buffer; 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.25% SDS, 0.25% sodium deoxycholate and 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 8.0) containing protease inhibitors (Complete<sup>®</sup> mini protease inhibitors; Roche, Basel, Switzerland) for the preparation of the whole cell lysate. The cell lysates were then centrifuged at 16,250 x g for 20 min at 4°C. The supernatant was collected, and the amount of protein was then determined using Bradford reagent (Sigma-Aldrich Ltd., Munich, Germany). For the preparation of the cytosolic lysate, the cells were lysed in cytosolic lysis buffer [10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane sulfonic acid (HEPES)-potassium hydroxide (KOH) pH 7.9, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 10 mM potassium chloride (KCl), 0.5 mM dithiothreitol (DTT) and 0.5% NP-40] to which protease inhibitors are added (Complete<sup>®</sup> mini protease inhibitors; Roche). The samples were subsequently incubated on ice for 20 min followed by centrifugation at 16,250 x g at 4°C for 5 min. The supernatant was collected, and the amount of protein was then determined using Bradford reagent (Sigma-Aldrich Ltd.). The samples were stored at -80°C until further analysis.

**Western blot analysis for SOD, HO-1, CAT and GCS proteins.** In order to measure the expression levels of SOD, HO-1, CAT and GCS, western blot analysis was used. In particular, whole cell lysate containing 50 µg of protein was used for the determination of the SOD, HO-1 and CAT expression levels, while cytosolic lysate containing 30-50 µg of protein was used for the determination of GCS levels. Cell lysates were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using an 8% polyacrylamide gel. Proteins were then transferred onto polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (Millipore, Bedford, MA, USA). The membranes



were blocked overnight with 5% non-fat milk in 13 mM Tris/150mM NaCl, pH 7.5, containing 0.2% Tween-20. They were then probed with polyclonal goat anti-human SOD-1 (1:1,600; Cat. no. sc-8634) or polyclonal rabbit anti-human GCS (1:1,600; Cat. no. sc-28965; both from Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, USA) or polyclonal goat anti-human HO-1 (1:1,400; Cat. no. AF3776) or polyclonal goat anti-human CAT (1:1,400; Cat. no. AF3398; both from R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) primary antibodies for 1 h at room temperature. The membranes were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated polyclonal goat anti-rabbit (1:5,000; Cat. no. 31462) or polyclonal donkey anti-goat (1:3,000; Cat. no. PA1-28659; both from Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) secondary antibodies for 30 min at room temperature. All the membranes were re-probed with polyclonal rabbit anti-mouse (anti-mouse) glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; 1:1,000; Cat. no. PA1-988; Thermo Scientific) to normalize the data. The optical density of the protein bands was measured using Alpha View quantification software (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA). Each experiment was repeated 3 times.

**Determination of CAT activity.** The determination of CAT activity in the whole cell lysate was carried out based on the method described in the study by Aebi (27). Specifically, the reaction was carried out in a volume of 3 ml containing 150  $\mu$ l whole cell lysate and 2,845  $\mu$ l of 67 mM potassium phosphate buffer solution (pH 7.4). The measurement requires >30  $\mu$ g total amount of protein in the tested sample. The samples were incubated for 10 min at 37°C. Five microliters of 30% w/v  $H_2O_2$  solution were added to the samples and the change in absorbance was immediately read at 240 nm (UV) for 1.5 min. CAT activity in the cell lysates was normalized to the total cellular protein level in each sample. The results are expressed as units ( $\mu$ mol of  $H_2O_2$  decomposed ml/min) per mg of protein. CAT activity was examined in at least 3 different lysates (each lysate was measured in triplicate).

**Determination of GST activity.** The determination of GST activity in the cytosolic lysate was based on the method described in the study by Habig *et al.* (28). More specifically, 920  $\mu$ l of phosphate buffer (100 mM, pH 7.4) were mixed with 50  $\mu$ l of GSH (1 mM) and 20  $\mu$ l of 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) and the samples were incubated for 5 min at 30°C. This was followed by the addition of 10  $\mu$ l of cytosolic lysate (the measurement requires >10  $\mu$ g of total amount of protein in the tested sample) and the change in absorbance was measured at 340 nm for 5 min. Upon conjugation of the thiol group of GSH to the CDNB substrate, there was an increase in the absorbance at 340 nm. The sample containing cytosolic lysate alone were used as the blank. GST activity in the cytosolic lysates was normalized to the total cellular protein level in each sample. The results are expressed as units ( $\mu$ mol of CDNB conjugate produced ml/min) per mg of protein. GST activity was examined in at least 3 different lysates (each lysate was measured in triplicate).

**Determination of SOD activity.** The determination of SOD activity in the whole cell lysate was based on the method of nitroblue tetrazolium salt (NBT) as described in the study by Oberley and Spitz (29). More specifically, this assay included a negative control which was prepared by mixing 800  $\mu$ l of SOD

buffer [1 mM diethylenetriaminepentaacetic acid (DETAPAC) in 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 7.8), 1 unit CAT,  $5.6 \times 10^{-3}$  M NBT and  $10^{-4}$  M xanthine] with 200  $\mu$ l of 0.05 M potassium phosphate buffer. Subsequently, ~60 mU of xanthine oxidase were added and the rate of increase in absorbance was measured at 560 nm for 3.5 min. In the test samples, 200  $\mu$ l of the total cell lysate (the measurement requires >10  $\mu$ g total amount of protein) were added to 800  $\mu$ l of SOD buffer followed by the addition of ~60 mU of xanthine oxidase and the rate of increase in absorbance was measured for 3.5 min at 560 nm. The calculation of SOD activity in the test samples is based on the percentage inhibition in the rate of increase in absorbance. The rate of increase in absorbance (A) per minute for the negative control and for the test samples was determined by the formula [1] and the percentage inhibition for each sample was calculated using the formula [2] as follows:

$$\Delta A_{560\text{ nm}}/\text{min} = (A_{560\text{ nm}} \text{ final} - A_{560\text{ nm}} \text{ initial})/3.5 \text{ min} \quad [1]$$

$$\% \text{ Inhibition} = [(A_{560\text{ nm}}/\text{min}_{\text{negative control}} - A_{560\text{ nm}}/\text{min}_{\text{sample}}) / A_{560\text{ nm}}/\text{min}_{\text{negative control}}] \times 100 \quad [2]$$

SOD activity in the whole cell lysates was normalized to the total cellular protein level in each sample. The results are expressed as units (one unit of SOD inhibits the rate of increase in absorbance at 550 nm by 50%) per mg of protein. SOD activity was examined in at least 3 different lysates (each lysate was measured in triplicate).

**Statistical analysis.** All results are expressed as the means  $\pm$  SD. For statistical analysis, one-way ANOVA was applied followed by Tukey's test for multiple pair-wise comparisons. Dose-response relationships were examined by Spearman's correlation analysis. Differences were considered statistically significant at  $P < 0.05$ . All statistical analyses were performed using SPSS software (version 14.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## Results

**Western blot analysis for SOD, HO-1, CAT and GCS protein expression.** In order to examine the effects of GPE on the expression levels of antioxidant enzymes (i.e., SOD, HO-1, CAT and GCS), the C2C12 muscle cells were treated with GPE at concentrations of 2.5 and 10  $\mu$ g/ml. The EA.hy926 endothelial cells were treated with GPE at concentrations of 0.068 and 0.250  $\mu$ g/ml.

Treatment with GPE at 2.5  $\mu$ g/ml significantly increased the GCS expression levels by 24.2 and 16.3% at 18 and 24 h, respectively compared to the control in the cytosolic lysate of C2C12 cells (Fig. 1A). However, treatment with GPE at 10  $\mu$ g/ml significantly increased the GCS levels in the C2C12 cells by 18.0, 20.3 and 26.1 at the 12, 18 and 24 h time points, respectively compared to the control (Fig. 1A). In the EA.hy926 endothelial cells, treatment with GPE at a concentration of 0.068  $\mu$ g/ml significantly increased the GCS levels by 14% at the 24 h time point, while treatment with GPE at the concentration of 0.250  $\mu$ g/ml led to a significant increase of 16.2% at 24 h time point compared to the control (Fig. 2A).

Moreover, the results revealed that treatment of the C2C12 cells with GPE at 2.5  $\mu$ g/ml significantly decreased the CAT



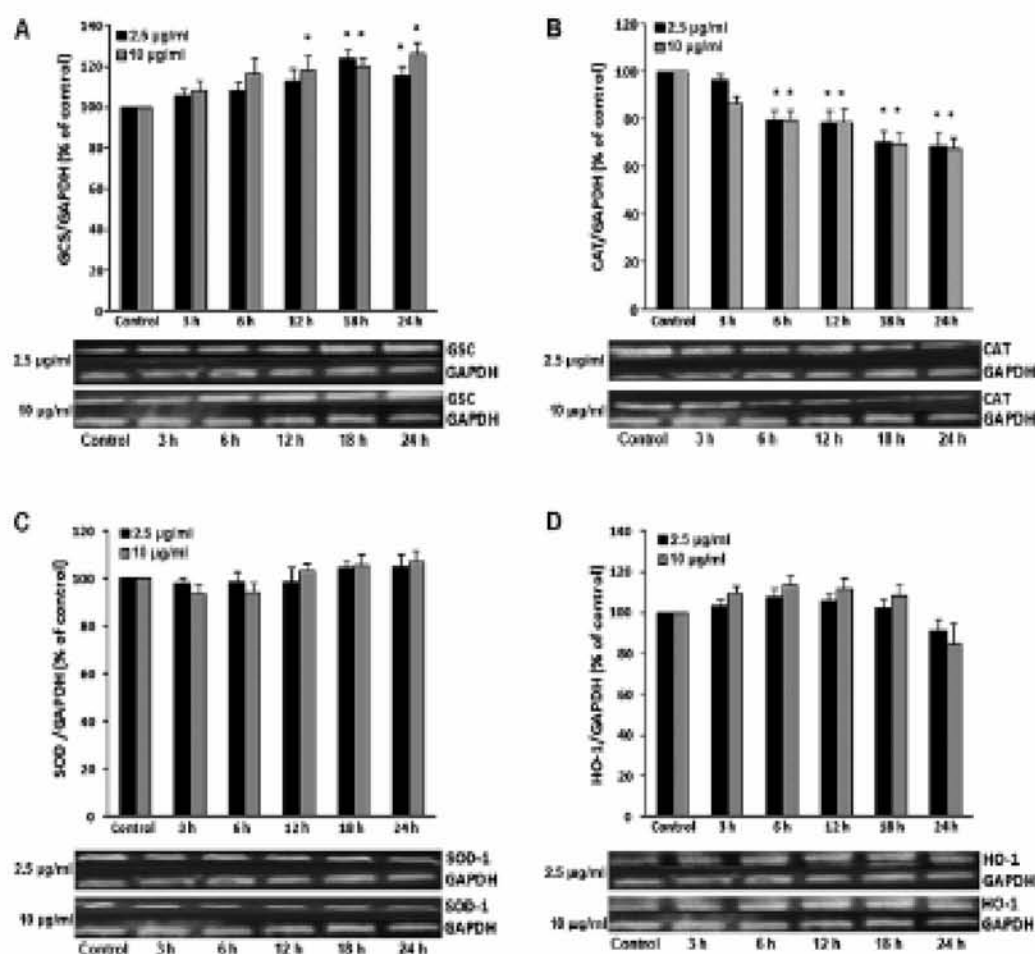


Figure 1. Representative western blots showing the effects of grape pomace extract (GPE) on the expression of (A) gamma-glutamylcysteine synthetase (GCS), (B) catalase (CAT), (C) superoxide dismutase (SOD) and (D) heme oxygenase 1 (HO-1) in C2C12 muscle cells. The results of densitometric quantification for all enzymes are also shown. The cells were incubated with GPE at 2.5 and 10 µg/ml for 3, 6, 12, 18 and 24 h. The expression of GAPDH was used as a loading control for normalization. \* $p < 0.05$ , statistically significant difference compared to the control (untreated cells). The results are presented as the mean  $\pm$  SEM.

expression levels by 20.4, 21.3, 29.2 and 31.5% at the 6, 12, 18 and 24 h time points, respectively, while treatment with GPE at 10 µg/ml decreased the CAT levels by 20.7, 22.5, 30.3 and 32.3% at the 6, 12, 18 and 24 h time points, respectively compared to control in the total lysate of C2C12 cells (Fig. 1B). However, in the EA.hy926 cells, GPE did not significantly affect CAT expression at any concentration used (Fig. 2B).

Furthermore, the results revealed that none of the GPE concentrations used significantly affected SOD expression at any time point in the total lysate of C2C12 cells compared to the control (Fig. 1C). Similar results were observed in the EA.hy926 endothelial cells (Fig. 2C).

As observed with SOD expression, treatment with GPE did not significantly alter the HO-1 expression levels at any tested concentration at any time point compared to the control in the total lysates of both the C2C12 (Fig. 1D) and EA.hy926 cells (Fig. 2D).

**Assessment of GST activity.** In the C2C12 muscle cells, treatment with GPE at the concentration of 2.5 µg/ml significantly

increased GST activity at the 18 and 24 h time points by 27.7 and 36.0%, respectively, while treatment with GPE at the concentration of 10 µg/ml increased GST activity by 37.7 and 59.0% at the 18 and 24 h time points, respectively compared to the control (Fig. 3A).

In the EA.hy926 endothelial cells, treatment with GPE at 0.068 µg/ml significantly increased GST activity at 24 h by 16.3%, while treatment with GPE at 0.250 µg/ml increased GST activity by 23.3 and 28.1% at 18 and 24 h, respectively compared to the control (Fig. 4A).

**Assessment of CAT activity.** In the C2C12 muscle cells, treatment with GPE at 2.5 µg/ml significantly decreased CAT activity by 12.7, 14.5 and 19.5% at the 12, 18 and 24 h time points, respectively compared to the control (Fig. 3B), while treatment with GPE at 10 µg/ml decreased CAT activity by 8.3, 21.0 and 26.1% at the 12, 18 and 24 h time points, respectively compared to the control (Fig. 3B).

In the EA.hy926 endothelial cells, treatment with GPE at concentrations of 0.068 and 0.250 µg/ml did not signifi-

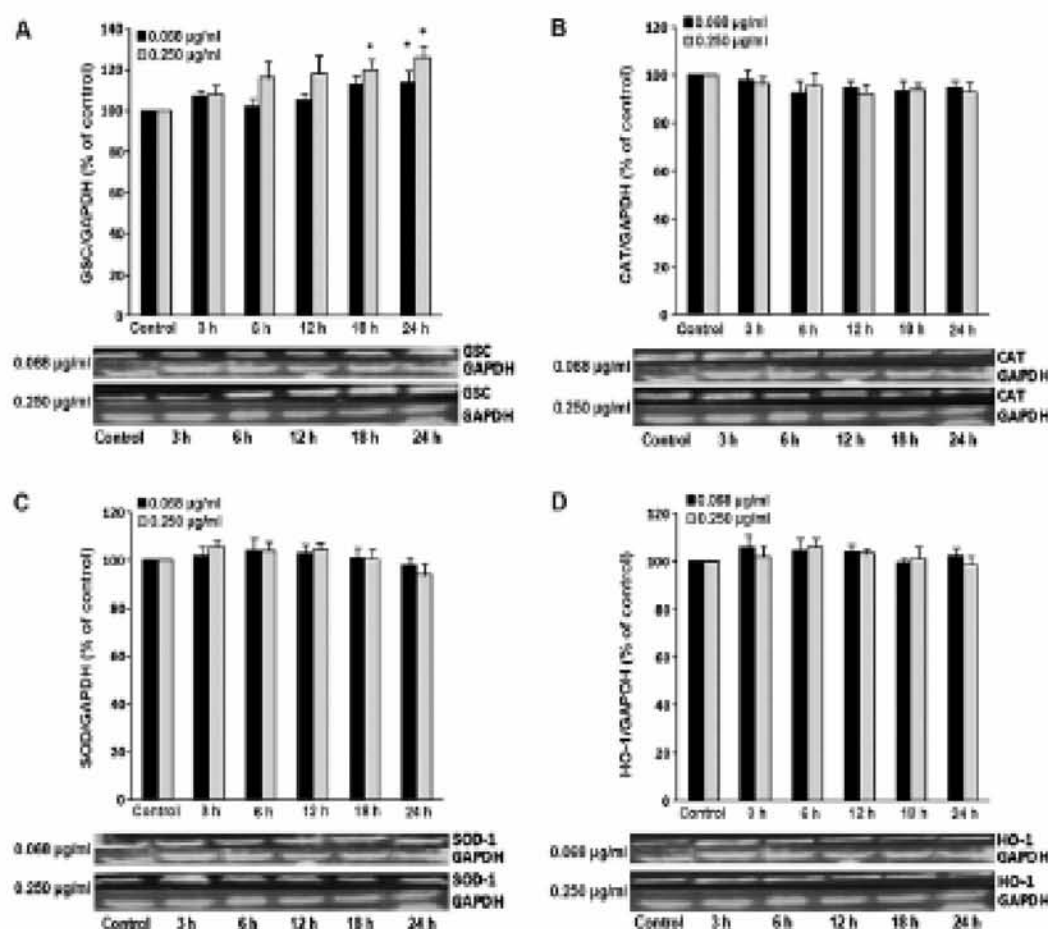


Figure 2. Representative western blots showing the effects of grape pomace extract (GPE) on the expression of (A) gamma-glutamylcysteine synthetase (GCS), (B) catalase (CAT), (C) superoxide dismutase (SOD) and (D) heme oxygenase 1 (HO-1) in EA.hy926 endothelial cells. The results of densitometric quantification for all enzymes are also shown. The cells were incubated with GPE at 0.068 and 0.250  $\mu\text{g/ml}$  for 3, 6, 12, 18 and 24 h. The expression of GAPDH was used as a loading control for normalization. \* $p < 0.05$ , statistically significant difference compared to the control (untreated cells). The results are presented as the means  $\pm$  SEM.

cantly affect CAT activity at any time point compared to the control (Fig. 4B).

**Assessment of SOD activity.** In the C2C12 muscle cells, treatment with GPE did not significantly affect SOD activity at any concentration used at any time points compared to the control (Fig. 3C). Similar results were observed in endothelial cells (Fig. 4C).

## Discussion

In a previous study, we demonstrated that GPE reduced oxidative stress in endothelial and muscle cells (25). In the present study, in order to investigate the mechanisms through which these antioxidant effects are exerted, the effects of GPE on antioxidant enzymes and molecules were assessed in the EA.hy926 endothelial and C2C12 muscle cell lines. It should be noted that the GPE concentrations used were non-cytotoxic and very low, as in several studies on antioxidant compounds, high concentrations are used which are either difficult to be achieved in a human organism or they exhibit toxicity.

GSH, a tripeptide composed of glycine, cysteine and glutamic acid, is one of the most critical antioxidant molecules in cells and is involved in the detoxification of a number of xenobiotics and ROS through either the formation of S-conjugates or by serving as an electron donor from its sulfhydryl group (-SH) (30). Conjugation with GSH can occur both enzymatically and non-enzymatically. In human organisms, there are 3 main GSH systems: the GSH/glutathione peroxidase (GPx) system, which buffers  $\text{H}_2\text{O}_2$  produced during cellular metabolism (30); the GSH/GST system, which conjugates GSH with xenobiotics for their detoxification (30); and the GSH/glutaredoxin (Grx) system which controls the cellular redox environment (31). In a previous study, we demonstrated that GPE increased GSH levels in EA.hy926 and C2C12 cells under either naive or oxidative stress conditions (25). This increase in GSH levels is explained by the GPE-induced increase in the expression of the GCS enzyme in both EA.hy926 and C2C12 cells. GCS is the first enzyme in the biosynthetic pathway of GSH, and consequently, it is critical for cell survival (32). It has also been reported that flavonoids increase intracellular GSH levels by the



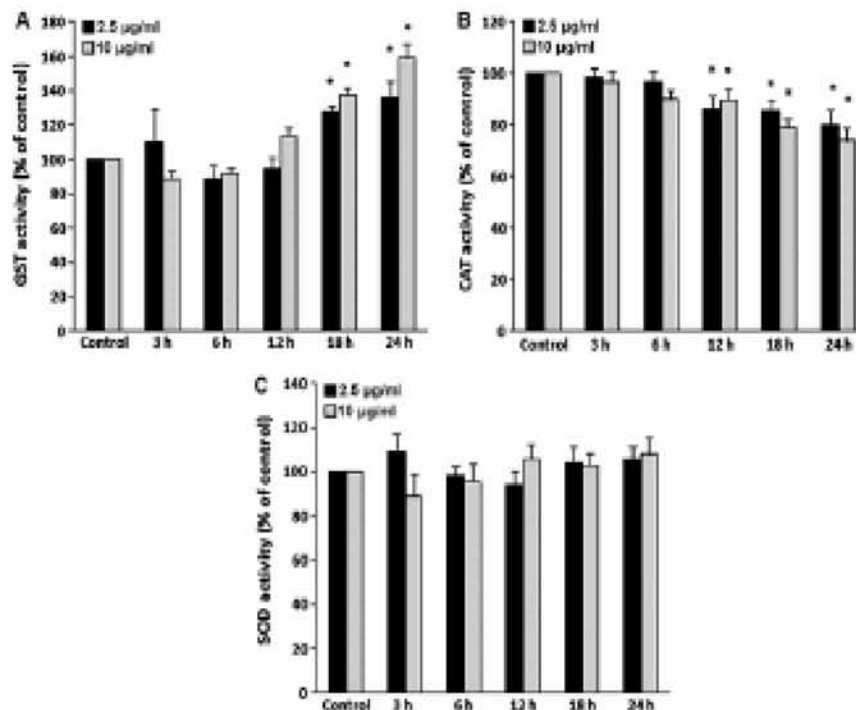


Figure 3. Effects of grape pomace extract (GPE) on the enzymatic activity of (A) glutathione S-transferase (GST), (B) catalase (CAT) and (C) superoxide dismutase (SOD) in C2C12 muscle cells. The cells were incubated with GPE at 2.5 and 10 µg/ml for 3, 6, 12, 18 and 24 h. The results are expressed as a percentage of the control values. \* $p < 0.05$ , statistically significant difference compared to the control (untreated cells). Results are presented as the means  $\pm$  SEM.

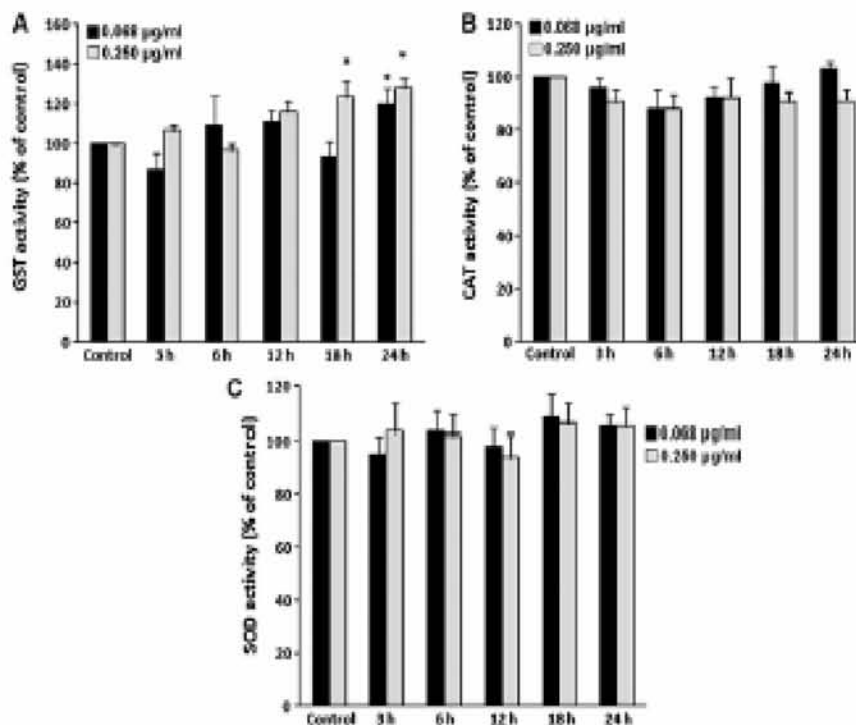


Figure 4. Effects of grape pomace extract (GPE) on the enzymatic activity of (A) glutathione S-transferase (GST), (B) catalase (CAT) and (C) superoxide dismutase (SOD) in EA.hy926 endothelial cells. The cells were incubated with GPE at 0.068 and 0.250 µg/ml for 3, 6, 12, 18 and 24 h. The results are expressed as a percentage of the control values. \* $p < 0.05$ , statistically significant difference compared to the control (untreated cells). Results are presented as the means  $\pm$  SEM.

transactivation of the GCS catalytic subunit promoter (33). The importance of GSH for the antioxidant activity of GPE is also supported by the GPE-induced increase in GST activity. GST is induced under conditions of oxidative stress and is involved in the detoxification of organic epoxides, hydroperoxides and unsaturated aldehydes formed particularly after lipid peroxidation (34). GST detoxifies these products through their conjugation with GSH. Of note, we have previously reported that GPE decreased products of lipid peroxidation in EA.hy926 and C2C12 cells (25). Consequently, this effect may be attributed to the GPE-induced increase in GST activity. The increase in GST activity may result in a decrease in GSH levels (34). However, it seems that the GPE-induced increase in GCS levels led to *de novo* GSH synthesis that hampered the decrease in GSH levels caused by GST activity.

Based on the above-mentioned findings, it can be inferred that GSH systems play a crucial role in the antioxidant effects exerted by GPE in endothelial and muscle cells. Moreover, several studies conducted *in vivo* and using cell cultures have shown that grape seed extracts exert antioxidant effects through the induction of GSH systems in a great variety of tissues and organs, such as the liver, kidneys, heart, skin, pancreas, blood, eyes and brain (34-40). Although a large number of studies have indicated that grape extracts from seeds enhanced GSH systems, there are only few studies available that have used grape pomace extracts (34,37,41-46). Our results provide further evidence that grape extracts, in general, act as antioxidants through the modulation of GSH systems.

GPE did not seem to exert its antioxidant effects through the modulation of the other tested antioxidant enzymes (i.e., CAT, SOD and HO-1 enzymes). SOD converts  $O_2^-$  generated during oxidative stress into  $H_2O_2$  (47).  $H_2O_2$  may be converted to harmful ROS, but it is broken down into harmless water and oxygen by CAT (48). In this study, treatment with GPE reduced both the expression and activity of the CAT enzyme in endothelial cells, while in muscle cells, it had no any effect. GPE did not affect the expression or the activity of SOD in the EA.hy926 and C2C12 cells. The fact that GPE had no any effect (or even decreased) the expression and activity of CAT and SOD enzymes may be explained by its ability to enhance other antioxidant mechanisms, such as GSH, GCS and GST. Similar to our results, other studies have reported that grape extracts did not affect CAT and SOD enzymes (34-49). However, the administration of GPE to rats has been shown to increase CAT and SOD activity in the liver and kidneys (41). Furthermore, grape seed extracts have been shown to increase CAT and SOD activity in different tissues (35,40). These discrepancies between the results of different studies may be attributed to the different tissues used, as well as to the different chemical composition of the tested extracts. In addition Yang *et al.* (49) reported that the effects of grape seed extract on CAT and SOD activity in eukaryotic cells depends on the presence or absence of oxidative stress stimulus and is mediated through the extracellular-signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) signaling pathway.

HO-1 is also considered an important antioxidant enzyme (50). HO-1 is an ubiquitous inducible cellular stress protein and is the rate-limiting enzyme in the catabolism of heme to biliverdin, free iron and carbon monoxide. Biliverdin is rapidly converted to the strong antioxidant, bilirubin, which

is then converted back into biliverdin through the reaction with ROS, leading to their neutralization (50). In this study, treatment with GPE did not affect HO-1 expression in the endothelial and muscle cells. Thus, the antioxidant effects of GPE do not seem to be mediated through HO-1 activity. Similar to our results, in a previous study, a grape seed extract rich in procyanidins was unable to increase HO-1 expression in liver cells (HepG2), although it induced the signaling pathway of nuclear factor E2-related factor (Nrf2)/antioxidant response element (ARE) (51). Nrf2/ARE is the main signaling pathway regulating HO-1 expression (52). In another study, the administration of grape extract to mice increased HO-1 expression levels through Nrf2 transcription factor in the testes (53). However, this grape extract was from seeds and was particularly rich in procyanidins. Furthermore, resveratrol, one of the main polyphenols present in grape extracts, has been shown to increase HO-1 activity in mouse neuronal cells (54).

In conclusion, the findings of this study demonstrated that treatment with GPE exerted antioxidant effects in endothelial and muscle cells mainly through the induction of GCS and GST enzymes. These results, along with those of our previous study (25), indicate that GPE increases GSH levels in EA.hy926 and C2C12 cells, suggesting the crucial role of GSH systems in the antioxidant effects of GPE. Thus, GPE may prove to be effective for use as a food supplement for the treatment of oxidative stress-induced pathological conditions of the cardiovascular and skeletal muscle systems, particularly those associated with low GSH levels. Although there are several studies showing that grape extracts from seeds protect cardiovascular and skeletal muscle systems from ROS-induced damage, there only few studies using extracts from pomace (40,55-63). Of course, *in vitro* studies are also required to confirm these findings.

#### Acknowledgements

This study was funded in part by the MSc programmes 'Biotechnology-Nutrition and Environment' and 'Molecular Biology and Genetics Applications' of the Department of Biochemistry and Biotechnology at the University of Thessaly.

#### References

- Vallo M, Leibfranz D, Menzel J, Grottel MT, Mann M and Toller J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39: 44-84, 2007.
- Halliwel B. Free radicals and other reactive species in disease. In: *Nature Encyclopedia of Life Sciences*. J. Wiley and Sons (eds). Nature Publishing Group, New York, 2001.
- Dupeyron-Cuche S and Erard Maud Nive O. ROS production in phytophytes: Why, when, and where? *J Leukoc Biol* 94: 657-670, 2013.
- Linnane AW, Zhang C, Yarovaya N, Kopylov G, Kowalewski S, Papakostopoulou F, Fairwood H, Graves S and Richardson M. Human aging and global function of coenzyme Q10. *Ann NY Acad Sci* 959: 396-405, 2002.
- Mylonas C and Kourouas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vitro* 13: 295-309, 1998.
- Schneider BS and Tindles PM. Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: How do we resolve the controversy? *Sports Med* 37: 837-856, 2007.
- Nikolaou MG, Kyriakos A, Hadziioannou M, Pano N, Samaras I, Januritis AZ and Kourouas D. Acute exercise markedly increases blood oxidative stress in boys and girls. *Appl Physiol Nutr Metab* 32: 197-205, 2007.



8. Meenu M, Nish J, Herman L, Goshert D and Cadden P. The role of mitochondrial dysfunction due to oxidative and mitochon stress in the chronic pain or chronic fatigue syndromes and fibromyalgia patients: Peripheral and central mechanisms as therapeutic targets? *Expert Opin Ther Targets* 17: 1081-1089, 2013.
9. Placent S and Leeuwenburgh C. Apoptosis and exercise. *Med Sci Sports Exerc* 33: 393-396, 2001.
10. McClung JM, Dennissen KC, Whalen MA, Van Remmen H, Richardson A, Song W, Vrabie JS and Powers SK. Overexpression of antioxidant enzymes in diaphragm muscle does not alter contraction-induced fatigue or recovery. *Exp Physiol* 95: 223-231, 2010.
11. Densford JE, Hakox JP and Rabekuk TJ. Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. *Circulation* 115: 1285-1295, 2007.
12. Hazel T and Muller T. Culture of neuroepithelial stem cells. *Curr Protoc Neurosci*. May 1, 2001 (Fifth ahead of print), doi: 10.1002/0471142301.nb010000.
13. Kokura S, Wolf RE, Yoshikawa T, Grainger DN and Aw TY. Molecular mechanisms of neurotrophin-endothelial cell adhesion induced by redox imbalance. *Circ Res* 84: 516-524, 1999.
14. Rhee SG. Cell signaling: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. *Science* 312: 1882-1885, 2005.
15. Weywood A, Bahammam FH, DeGroot K, Hulse H and Harkiss M. Circulating endothelial cells: Life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol Dial Transplant* 17: 1728-1730, 2002.
16. Marban CM, Goutzouroulas N, Sargis D, Sarafoglou E, Janouris A, Katschert SD, Harizianou SA, Tsatsakis AM and Kourtelas D. Pomegranate juice consumption increases GSH levels and reduces lipid and protein oxidation in human blood. *Food Chem Toxicol* 75: 1-6, 2014.
17. Samaras A, Tsirobas K, Paschalis E, Giannoulis G, Tripathi R, Tsirobas C, Becker AT, Goutzouroulas N and Kourtelas D. Effect of a special carbohydrate-protein bar and tomato juice supplementation on oxidative stress markers and vascular endothelial dynamics in ultra-marathon runners. *Food Chem Toxicol* 69: 251-256, 2014.
18. Katschert E, Katschert A, Vekoulis A, Janouris A, Tsirobas C, Tsatsakis AM, Kourtelas V, Sargis D, Kourtelas D and Kourtelas V. Effect of a special carbohydrate-protein cake on oxidative stress markers after exhaustive cycling in humans. *Food Chem Toxicol* 50: 2805-2810, 2012.
19. Bagchi D, Swaroop A, Preuss HG and Bagchi M. Free radical scavenging, antioxidant and cancer chemoprevention by grape seed proanthocyanidin: An overview. *Mutat Res* 768: 69-73, 2014.
20. Apostolou A, Sargis D, Galisova E, Spyrida A, Harizianou S, Porfess N, Tsirobas I, Wallace Hayes A, Tsatsakis AM and Kourtelas D. Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. *Food Chem Toxicol* 61: 60-68, 2013.
21. Sargis D, Vekoulis AS, Sargis D, Laskis K, Anastasiadi M, Harizianou SA, Tsirobas M, Tsatsakis E and Kourtelas D. Effects of grape extracts on the in vitro activity of enzymes involved in oxidative stress regulation. *In Vivo* 25: 657-662, 2011.
22. Sargis D, Katsouroulas N, Sargis P, Moutouk, A, Goutzouroulas K and Kourtelas D. Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* on nitrotyrosine C and lipoxigenase 1-induced nicking of DNA. *Int J Mol Med* 15: 1013-1022, 2005.
23. Sargis D, Katsouroulas G, Theodoridou D, Katsouroulas G, Magiatis P, Moutouk S and Kourtelas D. Activity of grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* against antigenicity induced by benzo(a)pyrene and hydrogen peroxide in *Salmonella typhimurium* strain TA102. *Mutat Res* 609: 165-175, 2006.
24. Sargis D, Sargis C, Magiatis P and Kourtelas D. Cytoprotective effects of grape extracts (*Vitis vinifera*) and polyphenols on nitrotyrosine C-induced sister chromatid exchanges (SCE) in human blood lymphocytes. *J Agric Food Chem* 55: 5246-5252, 2007.
25. Goutzouroulas N, Sargis D, Demetris N, Mavridou P, Katsouroulas H, Goutzouroulas S, Katsouras E, Alifantis N, Skalkousis I, Sargis A, *et al.* Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of aortic and endothelial cells. *Plant Exp Toxicol* 33: 1099-1112, 2014.
26. Vekoulis AS, Kyriakos A, Nikolaidis MG, Sargis D, Alifantis N, Halabalaki M, Chrousos K, Goutzouroulas N, Skalkousis I and Kourtelas D. The antioxidant effects of a polyphenol-rich grape pomace extract in vitro do not correspond in vivo using exercise as an oxidant stimulus. *Oxid Med Cell Longev* 2012: 183867, 2012.
27. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-126, 1984.
28. Hainy WH, Pabst MJ and Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139, 1974.
29. Oberley LW and Spitz DR. Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol* 105: 457-464, 1984.
30. Aquilino R, Baddell S and Christo MR. Glutathione: New roles in redox signaling for an old antioxidant. *Front Pharmacol* 5: 196, 2014.
31. Lu J and Redington A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med* 66: 75-87, 2014.
32. Dalton TP, Chen Y, Schneider SN, Nebert DW and Shertzer HG. Genetically altered mice to evaluate glutathione homeostasis in health and disease. *Free Radic Biol Med* 37: 1511-1526, 2004.
33. Myhrstad MC, Carlsen H, Nordström O, Blomhoff R and Mørkang JO. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytic subunit promoter. *Free Radic Biol Med* 32: 386-393, 2002.
34. Ferradito-Iglesias A, Quesada H, Diaz S, Pujado D, Bladé C, Aroca L, Salvadó MJ and Muñoz M. Combination of grape seed proanthocyanidin extract and diclofenac/acetic acid-rich oil increases the hepatic detoxification by GST mediated GSH conjugation in a lipid postprandial state. *Food Chem* 165: 14-20, 2014.
35. Filip A, Dacorogna D, Chibici S, Bolin P, Cui C, Radulescu I, Boljan L, Olteanu D, Muresan A and Protescu ID. The effects of grape seeds polyphenols on SK-H-1 mice skin treated with multiple doses of UV-B. *J Photochem Photobiol B* 105: 133-142, 2011.
36. Junges AG, Leal VO, Stockler-Pinto MR, Moreira NX and Mello D. Effects of grape powder supplementation on inflammatory and antioxidant markers in hemodialysis patients: A randomized double-blind study. *J Bras Nefrol* 36: 496-501, 2014.
37. Chen J, Qu Z, Fang H, Fu L, Wu Y, Wang H, Zang H and Wang W. Effects of grape seed proanthocyanidin extract on pentamethazine-induced kidney and associated cognitive impairment in rats. *Int J Mol Med* 34: 391-398, 2014.
38. Yousef MH, Said AA and El-Shennawy LC. Protective effect of grape seed proanthocyanidin extract against oxidative stress induced by cisplatin in rats. *Food Chem Toxicol* 47: 1175-1183, 2009.
39. Zhang X and Hu Y. Inhibitory effects of grape seed proanthocyanidin extract on selenium-induced carbonyl formation and possible mechanism. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci* 32: 613-619, 2012.
40. Said HN, Said UZ, Meky NH and Abd El Azize AS. Grape seed extract *Vitis vinifera* protects against radiation-induced oxidative damage and metabolic disorders in rats. *Phytolther Res* 23: 434-438, 2009.
41. Laskis BV, Shalshur M and Aghara M. Protective potential of black grapes against lead induced oxidative stress in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 35: 361-368, 2013.
42. Chen S, Zhu Y, Liu Z, Guo Z, Li B, Zhang D, Zhang Z, Tang X, Liu Z, Meng L, *et al.* Grape seed proanthocyanidin extract ameliorates diabetic bladder dysfunction via the activation of the NF- $\kappa$ B pathway. *PLoS One* 10: e0126457, 2015.
43. Chen Q, Zhang R, Li WM, Niu YZ, Guo HC, Liu XH, Hou YC and Zhao LJ. The protective effect of grape seed proanthocyanidin extract against cadmium-induced renal oxidative damage in mice. *Environ Toxicol Pharmacol* 36: 759-768, 2013.
44. Song Q, Shi Z, Bi W, Liu R, Zhang Q, Wang K and Dang X. Beneficial effect of grape seed proanthocyanidin extract in rabbits with steroid-induced osteonecrosis via protecting against oxidative stress and apoptosis. *J Orthop Sci* 20: 196-204, 2015.
45. Chikhanur Murthy KN, Singh RP and Jayaprakasha GK. Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. *J Agric Food Chem* 50: 5905-5914, 2002.
46. Chikhanur Murthy KN, Singh RP and Jayaprakasha GK. Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. *J Agric Food Chem* 50: 5905-5914, 2002.
47. Fritzsche I. Superoxide dismutase: Anti-versus pro-oxidant? *Antioxid Agents Med Chem* 11: 175-177, 2011.
48. Kodjowski J, Vetrov J, Kocik M and Zák A. Human catalase, its polymorphism, regulation and changes of its activity in different diseases. *Folia Biol (Pilsen)* 60: 153-167, 2014.
49. Yang T, Li X, Zhu W, Chen C, Sun Z, Tan Z and Kang J. Alteration of antioxidant enzymes and associated genes induced by grape seed extracts in the primary muscle cells of goats in vivo. *PLoS One* 9: e107670, 2014.



50. Son Y, Lee JH, Chung HT and Pae HO: Therapeutic roles of heme oxygenase-1 in metabolic diseases: Curcumin and resveratrol analogues as possible inducers of heme oxygenase-1. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 639541, 2013.
51. Bak MJ, Jun M and Jeong WS: Procyanidins from wild grape (*Vitis amurensis*) seeds regulate ARE-mediated enzyme expression via Nrf2 coupled with p38 and PI3K/Akt pathway in HepG2 cells. *Int J Mol Sci* 13: 801-818, 2012.
52. Jeong WS, Jun M and Kong AN: Nrf2: A potential molecular target for cancer chemoprevention by natural compounds. *Antioxid Redox Signal* 8: 99-106, 2006.
53. Li SG, Ding YS, Niu Q, Xu SZ, Pang LJ, Ma RL, Jing MX, Feng GL, Liu JM and Guo SX: Grape seed proanthocyanidin extract alleviates arsenite-induced oxidative reproductive toxicity in male mice. *Biomol Environ Sci* 28: 272-280, 2015.
54. Sakata Y, Zhuang H, Kwansa H, Koehler RC and Dooré S: Resveratrol protects against experimental stroke: Putative neuroprotective role of heme oxygenase 1. *Exp Neurol* 224: 325-329, 2010.
55. Lataak B, Kosiorek A, Sykka K, Rozalski M, Bajak M, Podsedek A, Balcerzak E, Watala C and Grolandski J: Does grape seed extract potentiate the inhibition of platelet reactivity in the presence of endothelial cells? *Adv Med Sci* 99: 178-182, 2014.
56. Luna SS, Yu F, Li BY, Qin RJ, Li XL, Cai Q, Yin WB, Cheng M and Gao HQ: Quantitative proteomics study of protective effects of grape seed procyanidin B2 on diabetic cardiomyopathy in db/db mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 78: 1577-1583, 2014.
57. Milenkovic D, Vanden Berghe W, Boly C, Lemus C, Dedderck K, Scaer vel Sinc K, Heynrick K, Laukens K, Bizez M, Defrance M, et al: Dietary flavonoids modulate the transcription of genes associated with cardiovascular pathology without changes in their DNA methylation state. *PLoS One* 24: e95527, 2014.
58. Balducci M, Abedi HA, Sarkaki AR and Dianat M: Co-administration of grape seed extract and exercise training improves endothelial dysfunction of coronary vascular bed of STZ-induced diabetic rats. *Iran Red Crescent Med J* 15: e2624, 2013.
59. Pajuelo D, Fernández-Iglesias A, Díaz S, Quesada H, Aróla-Arnal A, Bladé C, Salvadó J and Aróla L: Improvement of mitochondrial function in muscle of genetically obese rats after chronic supplementation with proanthocyanidins. *J Agric Food Chem* 59: 8491-8498, 2011.
60. Ding Y, Dai X, Jiang Y, Zhang Z, Bao L, Li Y, Zhang F, Ma X, Cai X, Jing L, et al: Grape seed proanthocyanidin extracts alleviate oxidative stress and ER stress in skeletal muscle of low-dose streptozotocin- and high carbohydrate-high-fat diet-induced diabetic rats. *Mol Nutr Food Res* 57: 365-369, 2013.
61. Pajuelo D, Díaz S, Quesada H, Fernández-Iglesias A, Muñoz M, Aróla-Arnal A, Salvadó MJ, Bladé C and Aróla L: Acute administration of grape seed proanthocyanidin extract modulates energetic metabolism in skeletal muscle and BAT mitochondria satrigonemias group. *Agric Food Chem* 59: 4279-4287, 2011.
62. Diaz MN, Frei B, Vita JA and Kramsey JF Jr: Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* 337: 408-416, 1997.
63. Rodríguez-Rodríguez R, Juto MI, Claro CM, Vila E, Parrado J, Herrera MD and Álvarez de Sotomayor M: Endothelium-dependent vasodilator and antioxidant properties of a novel enzymatic extract of grape pomace from wine industrial waste. *Food Chem* 135: 1044-1051, 2012.

## Polyphenolic composition of grape stem extracts affects antioxidant activity in endothelial and muscle cells

NIKOLAOS GOUTZIOURELAS<sup>1</sup>, DIMITRIOS STAGOS<sup>1</sup>, YPATIOS SPANIDIS<sup>1</sup>, MARIA LIOSI<sup>1</sup>, ANNA APOSTOLOU<sup>2</sup>, ALEXANDROS PRIPTIS<sup>1</sup>, SERKO HAROUTOUNIAN<sup>2</sup>, DEMETRIOS A. SPANDIDOS<sup>3</sup>, ARISTIDIS M. TSATSAKIS<sup>4</sup> and DEMETRIOS KOURETAS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, 41221 Larissa;

<sup>2</sup>Laboratory of Nutrition Physiology and Feeding, Agricultural University of Athens, 11855 Athens;

<sup>3</sup>Laboratory of Clinical Virology, Medical School, University of Crete, 71409 Heraklion; <sup>4</sup>Department of Forensic Sciences and Toxicology, Medical School, University of Crete, 71003 Heraklion, Greece

Received July 10, 2015; Accepted August 12, 2015

DOI: 10.3892/mmr.2015.4216

**Abstract.** The aim of the present study was the assessment of the antioxidant effects of polyphenolic extracts derived from the stems of three Greek grape varieties (Moshomayro, Mavrotragano and Mandilaria) in endothelial (EA.hy926) and muscle (C2C12) cells. We also investigated the effects of the polyphenolic composition on the antioxidant effects of the grape stem extracts. For this purpose, the endothelial and muscle cells were treated with low non-cytotoxic concentrations of the extracts for 24 h in order to assess the effects of the extracts on cellular redox status using oxidative stress biomarkers. The oxidative stress markers were thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), protein carbonyl (CARB) levels, reactive oxygen species (ROS) levels and glutathione (GSH) levels. The results revealed that treatment of the EA.hy926 cells with

Mandilaria extract significantly decreased the TBARS levels by 14.8% and the CARB levels by 25.9 %, while it increased the GSH levels by 15.8% compared to the controls. Moreover, treatment of the EA.hy926 cells with Mavrotragano extract significantly increased the GSH levels by 20.2%, while it significantly decreased the TBARS and CARB levels by 12.5% and 16.6%, respectively. Treatment of the C2C12 cells with Mandilaria extract significantly decreased the TBARS levels by 47.3 %, the CARB levels by 39.0 % and the ROS levels by 21.8%, while it increased the GSH levels by 22.6% compared to the controls. Moreover, treatment of the C2C12 cells with Mavrotragano significantly decreased the TBARS, CARB and ROS levels by 36.2%, 35.9% and 16.5%, respectively. In conclusion, to the best of our knowledge, our results demonstrate for the first time that treatment with grape stem extracts at low concentrations improves the redox status of endothelial and muscle cells. Thus, grape stem extracts may be used for developing antioxidant food supplements or biofunctional foods. However, it was also found that the polyphenolic composition of grape stem extracts affects their antioxidant capacity. For example, the results suggested that *trans*-resveratrol, gallic acid, (+)-catechin, ferulic acid, caffeic acid, quercetin, coumaric acid and kaempferol may be essential for the antioxidant activity of grape stem extracts.

**Correspondence to:** Professor Demetrios Kouretas, Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Ploutonos 26 and Aiolou St., 41221 Larissa, Greece  
E-mail: dkouret@uth.gr

**Abbreviations:** APTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid); CARB, protein carbonyl; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; DCF-DA, 2,2'-dichlorofluorescein diacetate; DNPH, 2,4-dinitrophenylhydrazine; DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; FBS, fetal bovine serum; GSH, glutathione; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, hydrogen peroxide; HRP, horseradish peroxidase; NADH, 2-deoxyribose, nicotinamide adenine dinucleotide; NBT, nitroblue tetrazolium; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, superoxide radical; OH<sup>•</sup>, hydroxyl radical; PBS, phosphate-buffered saline; PMS, phenazine methosulfate; ROO<sup>•</sup>, peroxy radical; ROS, reactive oxygen species; TBA, thiobarbituric acid; TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; TCA, trichloroacetic acid; TPC, total polyphenolic content

**Key words:** antioxidant, oxidative stress, polyphenols, grape stem extracts, endothelial cells, muscle cells, flow cytometry

### Introduction

Reactive oxygen species (ROS) are chemically reactive molecules containing oxygen. ROS include free radicals, such as superoxide radical (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), hydroxyl radical (OH<sup>•</sup>) and peroxy radical (ROO<sup>•</sup>), as well as non-radical species, such as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), which are products of normal metabolism, inflammation, phagocytosis, intracellular signaling, cell proliferation, apoptosis or other physiological processes (1,2). Oxidative stress is defined as an imbalance between the production of free radicals and the ability of the organism to counteract or detoxify their harmful effects through neutralization by antioxidants (1). As free radicals are very reactive species, their overproduction during oxidative stress can cause damage to all



biological macromolecules, such as DNA, proteins and lipids, thus leading to cell damage and subsequently, to the manifestation of pathological conditions (1).

Oxidative stress occurs frequently in muscle tissue. In particular, during intense exercise, there is a high rate of  $O_2$  consumption in skeletal muscle that can cause incomplete  $O_2$  reduction and electron leakage from the electron transfer chain, leading to the generation of ROS and oxidative stress, that in turn result in muscle fatigue, cell damage and apoptosis (2-4).

Furthermore, oxidative stress-induced damage of the vascular endothelium is one of the most important factors of cardiovascular diseases (5-7). For example, oxidative stress in endothelial cells induces acute and chronic phases of leukocyte adhesion to the endothelium (8,9). In addition, the interaction between ROS and nitric oxide sets off a vicious circle which results in further endothelial activation and inflammation (5). Moreover, ROS, such as  $H_2O_2$ , can diffuse throughout endothelial cells and react with cysteine groups in proteins to modify their function (10). Thus, under conditions of oxidative stress, endothelial cells can lose integrity, progress to senescence and detach into the circulation (11).

However, every living organism has antioxidant mechanisms to counteract oxidative stress (1). Apart from the endogenous antioxidant mechanisms, the supplementation of antioxidants through diet may be used to reduce the detrimental effects of oxidative stress on human health as suggested by our previous studies (12,13). Some of the most well known food sources of antioxidants are grapes and wine (14). Our research group has conducted several studies on the antioxidant properties of grapes which are attributed mainly to their polyphenolic content (15-21). We have also conducted a series of studies on the antioxidant activity of extracts from grape stems, a by-product of the winemaking process which has been little investigated (15,22-25). For example, in one of our previous studies, we demonstrated that grape stem extracts are rich in bioactive polyphenols (e.g., flavonoids, stilbenes and phenolic acids) (22) and exhibit strong free radical scavenging activity *in vitro* (15).

Thus, the aim of the present study was firstly to examine the antioxidant effects of stem extracts from three Greek grape (*Vitis vinifera*) varieties (i.e., Mandilaria, Mavrotragano and Moshomavro) at a cellular level, particularly in human umbilical vein endothelial EA.hy926 and C2C12 muscle cells. Moreover, since the polyphenolic composition has been shown to affect the antioxidant activity of wine and grape seed extracts (26,27), we also investigated whether the polyphenolic composition of grape stem extracts affects their antioxidant capacity. Grape stem extracts may be used as antioxidant food supplements for reducing the oxidative stress-induced detrimental effects on human health, and thus the understanding of the mechanisms through which they exert their bioactivities is of particular importance.

## Materials and methods

**Chemicals, reagents and culture medium.** Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), phosphate-buffered saline (PBS) and trypsin were purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic

acid), diammonium salt (ABTS), horseradish peroxidase (HRP), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric chloride, 2-deoxyribose, nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), nitroblue tetrazolium (NBT), phenazine methosulfate (PMS), mercury orange and 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Trichloroacetic acid (TCA) and 2-thiobarbituric acid (TBA) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and potassium ferricyanide was obtained from AppliChem (Dresden, Germany). The cell proliferation kit II (XTT) was purchased from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany).

**Preparation of the extracts.** The stem extracts were prepared from the Greek grape varieties, Mandilaria, Mavrotragano and Moshomavro. The isolation of the extracts was performed as described in a previous study of ours (15). In brief, 50 g of dried sample (powdered grape stems) were poured into a 200 ml mixture of methanol ( $MeOH$ )/ $H_2O$ /1.0 N  $HCl$  (90:9:50.5 v/v) and sonicated in an ultrasonic bath for 10 min. The solvent was separated by filtration, and the remaining solid was re-extracted three additional times, using the same solvent system and procedure. The combined extracts were evaporated under vacuum, resulting in a slurry, which was dissolved in 30 ml of  $MeOH/H_2O$  (1:1) and centrifuged for 10 min (7,000 rpm). The supernatant liquid was extracted with petroleum ether (3x30 ml) to remove the lipids and concentrated under a vacuum. The remaining residue was poured into 30 ml of brine and extracted repetitively with ethyl acetate ( $EtOAc$ , 4x30 ml). Thus, all sugars remained in the aqueous layer. The combined organic layers were then dried over anhydrous magnesium sulfate and evaporated under a vacuum. The remaining solid was weighed and dissolved in  $MeOH$  to 1 mg/ml, and membrane filtered (0.45  $\mu m$ ). To avoid polyphenol degradation, all of the aforementioned activities were performed in the absence of direct sunlight and at temperatures below 35°C.

**Assessment of the polyphenolic composition of the extracts.** The total polyphenolic content (TPC) of the extracts was identified by the Folin-Ciocalteu method as previously described (15). Briefly, a 100  $\mu l$  sample of extract was added to a 10 ml flask containing 6 ml of deionized water. One milliliter of Folin-Ciocalteu reagent was added to the mixture, and the flask was stoppered and allowed to stand at room temperature for 3 min. A 1.5 ml portion of 20%  $Na_2CO_3$  was added and the solution was diluted to the desired volume (10 ml) with deionized water. The absorbance was measured at 725 nm versus a blank after 2 h at room temperature. The results are expressed as gallic acid equivalents using the standard curve (absorbance versus concentration) prepared from authentic gallic acid.

The polyphenolic composition of the extracts was assessed by high pressure liquid chromatography (HPLC) as previously described (15). Specifically, HPLC was carried out on a Hewlett Packard HP1100 system equipped with a quaternary pump and degasser. The column used was a Kromasil C18 column (250 mm x 4.6 mm, particle size 5  $\mu m$ ) with a guard column of the same material (8x4 mm). Injection was by means of a Rheodyne injection valve (model 7725i) with a 20  $\mu l$  fixed loop. For the chromatographic analyses, HPLC grade water was prepared using a Milli-Q system, whereas all HPLC solvents were filtered prior to use through cellulose acetate membranes



of 0.45 µm pore size. Chromatographic data were acquired and processed using Chemstation software. More specifically, the analysis was carried out at 30°C (maintained by a column thermostat) using samples of 20 µl, which were directly injected by means of a Rheodyne injection valve (model 7725). The gradient eluted consisted of solvent A (obtained by the addition of 3% acetic acid in 2 mM sodium acetate aqueous solution) and solvent B (acetonitrile, CH<sub>3</sub>CN). Run time was set at 70 min with a constant flow rate at 1.0 ml/min in accordance with the following gradient time table: at zero time, 95% A and 5% B; after 45 min, the pumps were adjusted to 85% A and 15% B; at 60 min, 65% A and 35% B; at 65 min, 50% A and 50% B; and finally at 70 min, 100% B. This routine was followed by a 30-min equilibration period with the zero time mixture prior to injection of the next sample. The analysis was monitored at 290, 320, and 360 nm simultaneously. Three replicate experiments were carried out for each sample examined. Peaks were identified by comparing their retention time and UV-vis spectra with the reference compounds, and data were quantified using the corresponding curves of the reference compounds as standards. All standards were dissolved in methanol.

**Cell culture conditions.** The EA.hy926 cells were a gift from Professor Koutoulis (University of Thessaly, Larissa, Greece) and the C2C12 muscle cells were a gift from Professor Koutsilieris (National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece). All cells were cultured in normal DMEM, containing 10% (v/v) PBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml of penicillin and 100 U/ml of streptomycin (all from Gibco, Paisley, UK) in plastic disposable tissue culture flasks at 37°C in 5% carbon dioxide.

**Cell viability assay.** The effects of the grape stem extracts on cell viability were assessed using the XTT assay kit (Roche Diagnostics) as previously described (21). Briefly, the cells were subcultured in a 96-well plate with 1x10<sup>5</sup> cells per well in DMEM. After 24 h of incubation, the cells were treated with increasing concentrations of the extracts in serum-free DMEM for 24 h. A total of 50 µl of XTT test solution, which was prepared by mixing 50 µl of XTT labeling reagent with 1 µl of electron coupling reagent, was then added to each well. After 4 h of incubation, the absorbance was measured at 450 nm and also at 690 nm as a reference wavelength in a Bio-Tek ELx800 microplate reader (Winooski, VT, USA). DMEM serum-free medium was used as a negative control. In addition, the absorbance of each grape extract concentration alone in DMEM serum-free medium and XTT test solution was tested at 450 nm. The absorbance values shown by the grape extracts alone were subtracted from those derived from cells treated with the grape extracts. Data were calculated as a percentage of inhibition using the following formula: inhibition (%) = [(OD control - OD sample)/(OD control) x100], where OD control and OD sample indicate the optical density of the negative control and the tested substances, respectively. All experiments were carried out in triplicate and at least on 2 separate occasions.

**DPPH radical scavenging assay.** The DPPH radical scavenging activity of the grape stem extracts was evaluated as previously described (15). Briefly, a 1.0 ml freshly prepared methanolic solution of DPPH radical (100 µM) was mixed with the test

extract solution at different concentrations. The contents were vigorously mixed, incubated at room temperature in the dark for 30 min and the absorbance was read at 517 nm. In each experiment, the test extract alone in methanol was used as a blank and DPPH radical alone in methanol was used as a control. The percentage of inhibition of DPPH radical by the tested extracts was calculated according to the following equation: inhibition (%) = [(A control - A sample)/(A control) x100], where A control and A sample are the absorbance values of the control and the test sample, respectively. Moreover, in order to compare the radical scavenging efficiency of the extracts, the IC<sub>50</sub> value showing the concentration that caused 50% scavenging of DPPH radicals was calculated from the graph plotted inhibition percentage against extract concentration. All experiments were carried out in triplicate and at least on 2 separate occasions.

**ABTS<sup>•</sup> radical scavenging assay.** ABTS<sup>•</sup> radical scavenging activity was measured as described previously (15). In brief, ABTS<sup>•</sup> radicals were produced by mixing 2 mM ABTS with 30 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 6 µM HRP enzyme in 50 mM phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.5). Immediately following the addition of the HRP enzyme, the contents were vigorously mixed, incubated at room temperature in the dark and the reaction was monitored at 730 nm until stable absorbance was obtained. Subsequently, 10 µL of different extract concentrations were added to the reaction mixture and the decrease in absorbance at 730 nm was determined. In each experiment, the test extract alone containing 1 mM ABTS and 30 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 50 mM (PBS, pH 7.5) was used as a blank, while the formed ABTS<sup>•</sup> radical solution alone with 10 µL H<sub>2</sub>O was used as a control. The inhibition percentage and the IC<sub>50</sub> values were determined as described above for the DPPH method. All experiments were carried out in triplicate and at least on 2 separate occasions.

**Reducing power assay.** Reducing power was determined as previously described (28). Briefly, the extracts were dissolved in phosphate buffer (0.2 M, pH 6.6) at different concentrations. An aliquot (2.5 ml) of the sample solution was added to 2.5 ml of potassium ferricyanide (1%) and incubated at 50°C for 20 min. The samples were cooled on ice for 5 min. Subsequently, 2.5 ml TCA (10%) were added and the samples were centrifuged at 3,000 rpm for 10 min at 25°C. To the supernatant (2.5 ml), 2.5 ml deionized water and 500 µl ferric chloride (0.1%) were added and the samples were incubated at room temperature for 10 min. The absorbance was measured at 700 nm. All experiments were carried out in triplicate and at least on 2 separate occasions.

**Treatment of EA.hy926 and C2C12 cells with the grape stem extracts.** The cells were seeded in culture flasks and incubated for 24 h. The medium was then removed and replaced with serum-free medium containing the grape extracts at non-cytotoxic concentrations. Since one of the main purposes of the study was to examine the effects of the polyphenolic composition on the antioxidant activity of the extracts, the selected concentrations for all three tested extracts had the same total polyphenolic content and were expressed as 'µg of polyphenols/ml'. Thus, the selected concentrations used were 0.20 µg of polyphenols/ml for the EA.hy926 cells and 0.95 µg of polyphenols/ml for the



C2C12 cells. The cells were treated with the extracts for 24 h and were then trypsinized, collected and centrifuged twice at 300 x g for 10 min at 5°C. At the end of the first centrifugation, the supernatant fluid was discarded and the cellular pellet was resuspended in PBS. After the second centrifugation, the cell pellet was collected and used for measuring the levels of the oxidative stress markers, glutathione (GSH), ROS, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyl (CARB).

**Flow cytometric analysis of GSH and ROS levels.** The intracellular GSH and ROS levels were assessed by flow cytometry using mercury orange and DCF-DA, respectively as described previously (21). In particular, the fluorescent mercury orange binds directly to GSH, whilst DCF-DA within cells is deacetylated by esterases, and is further converted to fluorescent DCF by the oxidative action of ROS. A 400 µM stock solution of mercury orange was prepared in acetone and stored at 4°C, while a fresh 400 µM stock solution of DCF-DA was prepared in methanol. To assess the GSH and ROS levels, the cells were resuspended in PBS at 1x10<sup>6</sup> cells per ml and incubated in the presence of mercury orange (40 µM) or DCF-DA (10 µM) in the dark at 37°C for 30 min. The cells were then washed, resuspended in PBS and submitted to flow cytometric analysis using a FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson, Franklin Lakes NJ, USA) with excitation and emission wavelengths at 488 and 530 nm for ROS, and at 488 and 580 nm for GSH. In addition, forward angle and right angle light scattering indicating the cell size and cell internal complexity, respectively were measured. The cells were analysed at a flow rate of 1,000 events per second. Analyses were performed on 10,000 cells per sample and fluorescence intensities were measured on a logarithmic scale of 4 decades of the log of fluorescence. Data was analysed using BD Cell Quest software (Becton-Dickinson). Each experiment was repeated at least 3 times.

**Assessment of TBARS levels by spectrophotometry.** For the determination of TBARS levels, the cells were resuspended in PBS at 1x10<sup>6</sup> cells/ml. Subsequently, a slightly modified assay as described in the study by Keles *et al.* (29) was used as previously described (21). A total of 400 µl of cell suspension or 400 µl of PBS for the blank was mixed with 500 µl of 35% TCA and 500 µl of tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride (Tris-HCl) (200 mM, pH 7.4) and incubated for 10 min at room temperature. Afterwards, 1 ml solution consisting of 2 M Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and 55 mM thiobarbituric acid was added and the samples were incubated at 95°C for 45 min. The samples were cooled on ice for 5 min and vortexed following the addition of 1 ml of 70% TCA. The samples were then centrifuged at 15,000 x g for 3 min and the absorbance of the supernatant was read at 530 nm. The assay requires >30 µg absolute amount of protein in the test sample. The total protein concentration in the cell suspension was assayed using a Bradford reagent from Sigma-Aldrich. The calculation of the TBARS concentration was based on the molar extinction co-efficient of malondialdehyde. Each experiment was repeated at least 3 times.

**Assessment of CARB levels by spectrophotometry.** For the determination of CARB levels, the cells were resuspended in PBS at 1x10<sup>6</sup> cells/ml and then lysed by sonication.

Subsequently, a modified method as described in the study by Patsoukis *et al.* (30) was used as previously described (21). In brief, 200 µL of 20% TCA were added to 200 µl of cell lysate, and this mixture was incubated in an ice bath for 15 min and centrifuged at 15,000 x g for 5 min at 4°C. The supernatant fraction was discarded. In addition, 500 µl of 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH; in 2.5 N HCl) for the sample or 500 µl of 2.5 N HCl for the blank were added to the pellet. The samples were incubated in the dark at room temperature for 1 h, with intermittent mixing every 15 min and were centrifuged at 15,000 x g for 5 min at 4°C. The supernatant fraction was discarded, and 1 ml of 10% TCA was added to the pellet which was mixed and centrifuged at 15,000 x g for 5 min at 4°C. The supernatant fraction was discarded and 1 ml of ethanol-ethyl acetate (1:1 v/v) was added, vortexed and centrifuged at 15,000 x g for 5 min at 4°C. This washing step was repeated twice. The supernatant fraction was discarded, and 1 ml of 5 M urea (pH 2.3) was added, vortexed and incubated at 37°C for 15 min. The samples were centrifuged at 15,000 x g for 3 min at 4°C, and the absorbance was read at 375 nm. The calculation of the protein carbonyl concentration was based on the molar extinction co-efficient of DNPH. The assay requires >30 µg absolute amount of protein in the test sample. The total plasma protein concentration was evaluated using Bradford assay. Each experiment was repeated at least 3 times.

**Statistical analysis.** Data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test for multiple pairwise comparisons. The level of statistical significance was set at p<0.05. For all statistical analyses, SPSS software, version 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used. Data are presented as the means ± SEM.

## Results

**Polyphenolic composition of the grape stem extracts.** The TPC and the polyphenolic composition of the extracts were identified by HPLC and are presented in Table I. The TPC values were similar between the three extracts and ranged from 357 to 378 mg gallic acid/g dried extract. These TPC values were similar to those observed in one of our previous studies (15). Moreover, as we have previously found in other grape stem extracts (15,22), the extracts contained different classes of polyphenols, such as phenolic acids (i.e., gallic acid, caffeic acid, coumaric acid, ferulic acid and syringic acid), flavanols [(+)-catechin and (-)-epicatechin], flavonols (quercetin, rutin and kaempferol) and stilbenes (*trans-resveratrol*) (Table I). The amounts of some polyphenols did not differ significantly between the three extracts. These polyphenols were syringic acid (13.60-17.44 mg/g dried extract), (+)-catechin (8.49-12.49 mg/g dried extract) and rutin (12.06-15.93 mg/g dried extract) (Table I). However, the amounts of the other polyphenols presented marked differences between the three tested extracts. Thus, their ranges were 3.6-fold for gallic acid (7.39-26.96 mg/g dried extract), 4.2-fold for caffeic acid (0.54-2.32 mg/g dried extract), 1.9-fold for (-)-epicatechin (9.83-19.13 mg/g dried extract), 2.1-fold for coumaric acid (0.60-1.31 mg/g dried extract), 3.7-fold for ferulic acid (0.97-3.59 mg/g dried extract), 3.5-fold for *trans-resveratrol* (5.97-21.43 mg/g dried extract), 4.3-fold



Table I. Polyphenolic composition of the grape stem extracts.

Grape variety	Mavrotragano	Mandilaria	Moshomavro
Gallic acid	11.48 <sup>a</sup>	26.96 <sup>a</sup>	7.39 <sup>a</sup>
Syringic acid	17.44	13.60	15.98
Caffeic acid	0.54	2.32	0.64
(+)-Catechin	12.18	12.49	8.49
(-)-Epicatechin	19.13	9.83	12.63
Coumaric acid	0.75	1.31	0.60
Ferulic acid	3.59	4.10	0.97
Rutin	15.93	12.06	14.81
<i>trans</i> -resveratrol	9.09	21.43	5.97
Quercetin	3.94	17.33	8.01
Kaempferol	0.74	3.63	1.83
TPC <sup>b</sup>	357	378	373

<sup>a</sup>All values are mg/g dried extract. <sup>b</sup>TPC, total polyphenolic content as mg gallic acid/g dried extract.

Table II. Free radical scavenging activity against DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> radicals as well as reducing power of grape stem extracts.

Grape variety	DPPH <sup>•</sup> IC <sub>50</sub> <sup>b</sup>	ABTS <sup>•+</sup> IC <sub>50</sub> <sup>b</sup>	Reducing power <sup>a</sup> RP <sub>0.5AU</sub> <sup>b</sup>
Mandilaria	2.8±0.2	0.42±0.08	1.46±0.12
Mavrotragano	3.6±0.17	0.71±0.10	1.47±0.21
Moshomavro	6.5±0.23	0.90±0.11	2.92±0.23

<sup>a</sup>Values are presented as the means ± SEM of at least three independent experiments. <sup>b</sup>IC<sub>50</sub> and RP<sub>0.5AU</sub> values are expressed as µg of polyphenols/ml. DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; ABTS, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), diammonium salt.

for quercetin (3.94-17.33 mg/g dried extract) and 4.9-fold for kaempferol (0.74-3.63 mg/g dried extract) (Table I).

**Scavenging of free radicals.** All the extracts were examined for their free radical scavenging activity. The results revealed that all the extracts scavenged DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> radicals in a dose-dependent manner at low concentrations (Fig. 1A and B). In order to compare the radical scavenging efficiency of the extracts, the IC<sub>50</sub> value indicating the concentration that caused the scavenging of 50% of DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> radicals was calculated; graphs were created to plot the percentage of radical scavenging capacity against the extract concentration. The IC<sub>50</sub> values calculated from the DPPH radical scavenging assay were in the following order: Mandilaria extract (2.8±0.2 µg polyphenols/ml) > Mavrotragano extract (3.6±0.17 µg polyphenols/ml) > Moshomavro extract (6.5±0.23 µg polyphenols/ml) (Table II). In the ABTS<sup>•+</sup> radical scavenging assay, the order of potency of the extracts according to their IC<sub>50</sub> values was: Mandilaria extract (0.42±0.08 µg polyphenols/ml) > Mavrotragano extract (0.71±0.10 µg

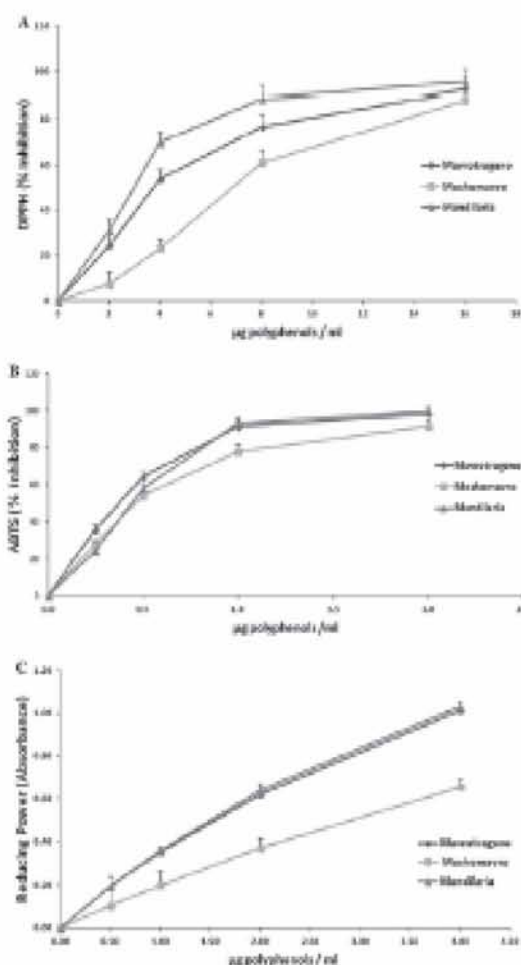


Figure 1. (A) Percentage 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH<sup>•</sup>) radical scavenging activity, (B) percentage 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS<sup>•+</sup>) radical scavenging activity and (C) reducing power of grape stem extracts from Mavrotragano, Moshomavro and Mandilaria varieties. Values are presented as the means ± SEM.

polyphenols/ml) > Moshomavro extract (0.90±0.11 µg polyphenols/ml) (Table II).

**Reducing power.** For the reducing power assay, the RP<sub>0.5AU</sub> the concentration that produces an absorbance of 0.5 at 700 nm, was determined (Fig. 1C). The RP<sub>0.5AU</sub> values of the tested extracts were in the following order: Mandilaria extract (1.46±0.12 µg polyphenols/ml) > Mavrotragano extract (1.47±0.21 µg polyphenols/ml) > Moshomavro extract (2.92±0.23 µg polyphenols/ml) (Table II).

**Effects of grape extracts on the viability of C2C12 and EA.hy926 cells.** XTT assay was used to assess the effects of the grape extracts on the viability of the C2C12 and EA.hy926 cells in order to select the non-cytotoxic concentrations for use in our experiments. The results revealed that all three extracts exhibited cytotoxicity at concentrations >1 µg polyphenols/ml in the EA.hy926 cells and >4 µg polyphenols/ml in the C2C12

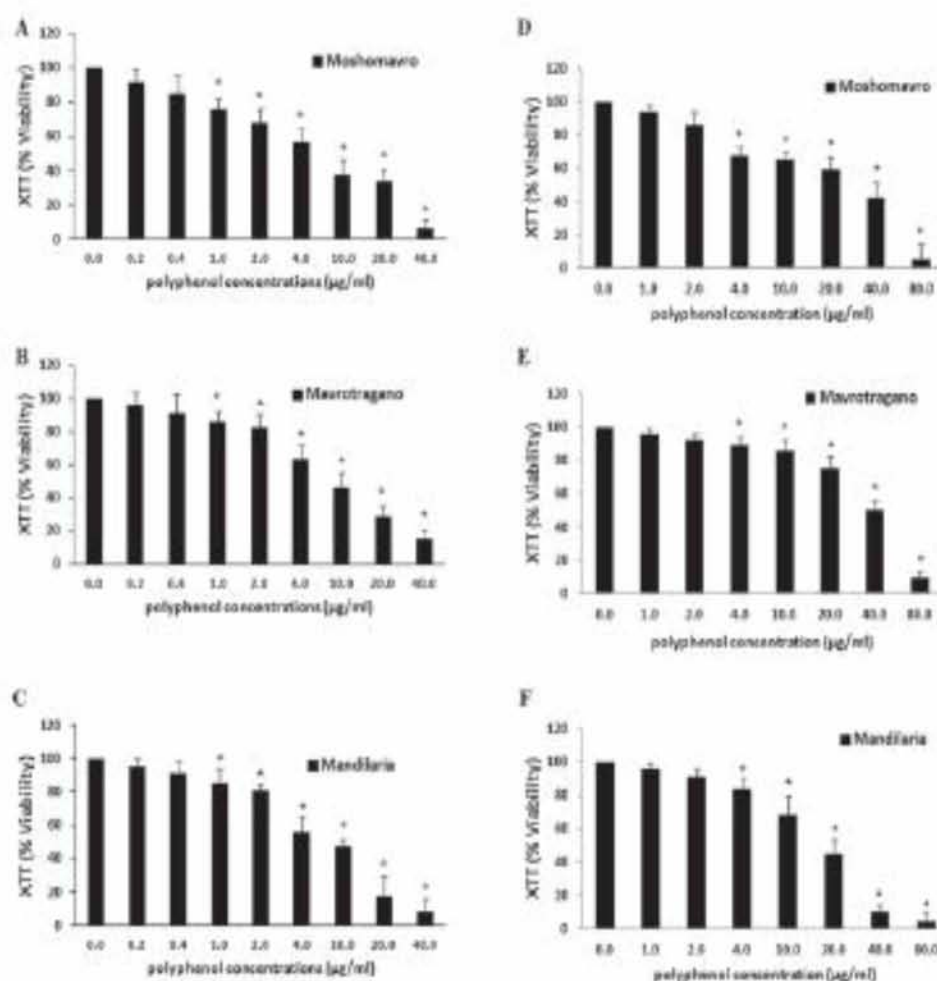


Figure 2. Cell viability following treatment with grape stem extracts from Moshomavro, Mavrotragano and Mandilaria varieties in (A-C) EA.hy926 cells and (D-F) C2C12 cells. The results are presented as the means  $\pm$  SEM of three independent experiments carried out in triplicate. \* $p < 0.05$  indicates significant difference from the control value.

cells (Fig. 2). Thus, the concentrations that were selected were 0.20 and 0.95  $\mu$ g polyphenols/ml for the EA.hy926 and C2C12 cells, respectively.

**Effects of treatment with grape extracts on the levels of oxidative stress markers in EA.hy926 cells.** The levels of oxidative stress markers were measured in order to assess effects of the extracts on the redox status of EA.hy926 cells. The ROS and GSH levels were measured by flow cytometry using DCF-DA and mercury orange, respectively. Histograms demonstrating the cell counts versus the fluorescence of the mercury orange or DCF-DA are shown in Fig. 3A and B, respectively. The mean fluorescence intensity values were evaluated using BD CellQuest software and are expressed as a percentage of the controls (untreated cells). None of the tested extracts had any effect on the ROS levels (Fig. 3C). Moreover, the Mavrotragano and Mandilaria extracts significantly increased the GSH levels by  $20.2 \pm 1.5$  and  $15.8 \pm 4.1\%$ , respectively compared to the

controls (Fig. 3C). On the contrary, Moshomavro extract did not affect the GSH levels.

Furthermore, lipid peroxidation and protein oxidation were assessed by measuring spectrophotometrically the levels of TBARS and CARB, respectively (Fig. 3C). Specifically, Mandilaria extract significantly reduced lipid peroxidation by  $14.8 \pm 2.3\%$  compared to the controls, Mavrotragano extract reduced lipid peroxidation by  $12.5 \pm 1.9\%$ , while Moshomavro extract had no effect. Similar to lipid peroxidation, treatment with Mandilaria extract exerted the most significant reducing effect on CARB levels by  $25.9 \pm 6.3\%$  (Fig. 3C). Mavrotragano extract reduced the CARB levels by  $16.6 \pm 1.3\%$  and Moshomavro extract did not have any effect on these levels.

**Effects of treatment with grape extracts on the levels of oxidative stress markers in C2C12 cells.** The histograms demonstrating the cell counts versus the fluorescence of mercury orange or DCF-DA in the C2C12 cells following treatment with the

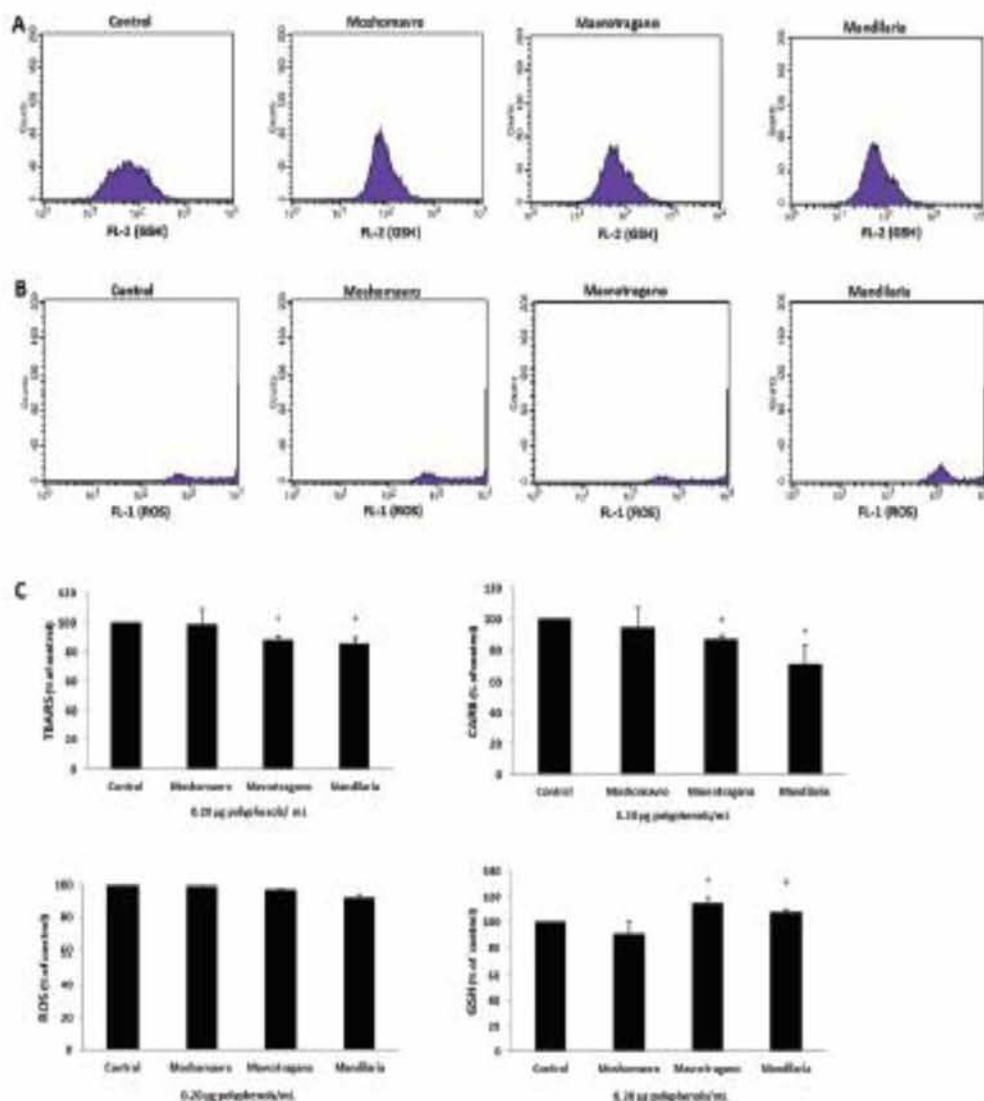


Figure 3. Effects of treatment with grape stem extracts for 24 h on levels of oxidative stress markers in EA.hy926 cells. (A) The histogram of cell counts versus fluorescence of 10,000 cells analyzed by the flow cytometry for the detection of glutathione (GSH) levels. FL-2 represents the detection of fluorescence using 488 and 580 nm as the excitation and emission wavelength, respectively. (B) The histograms show the cell counts versus fluorescence of 10,000 cells analyzed by the flow cytometry for the detection of reactive oxygen species (ROS) levels. FL-1 represents the detection of fluorescence using 488 and 530 nm as the excitation and emission wavelength, respectively. (C) Effects on TBARS, GSH, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyl (CARB) levels. TBARS and CARB levels were assessed using a spectrophotometer. All values are presented as the means  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $p < 0.05$  indicates significant difference compared to the controls (untreated cells).

grape extracts are shown in Fig. 4A and B, respectively. The Mandilaria and Mavrotragano extracts significantly decreased the ROS levels by  $21.8 \pm 2$  and  $16.5 \pm 3.7\%$ , respectively, while Moshomavro extract had no effect (Fig. 4C). Finally, Mandilaria extract significantly increased the GSH levels by  $22.6 \pm 4.5\%$  compared to the controls, while the other two extracts did not have any effect on these levels (Fig. 4C).

Moreover, Mandilaria extract significantly reduced the TBARS levels by  $47.3 \pm 1.2\%$ , and Mavrotragano extract by  $36.2 \pm 9.6\%$ , while Moshomavro extract had no effect compared to the controls in the C2C12 cells (Fig. 4C). In addition, Mandilaria extract exerted the greatest reducing effect on CARB

levels, decreasing them by  $39.0 \pm 5.1\%$  (Fig. 4C). Mavrotragano extract reduced the CARB levels by  $35.9 \pm 7.1\%$  and Moshomavro extract did not have any effect on these levels (Fig. 4C).

## Discussion

Grape extracts and wine have been the center of attention of researchers, demonstrating their beneficial effects on human health (14). For example, food supplements termed as 'grape seed extracts' are consumed worldwide for their beneficial effects on human health. However, the majority of studies on grapes refer to extracts from seeds, skins and



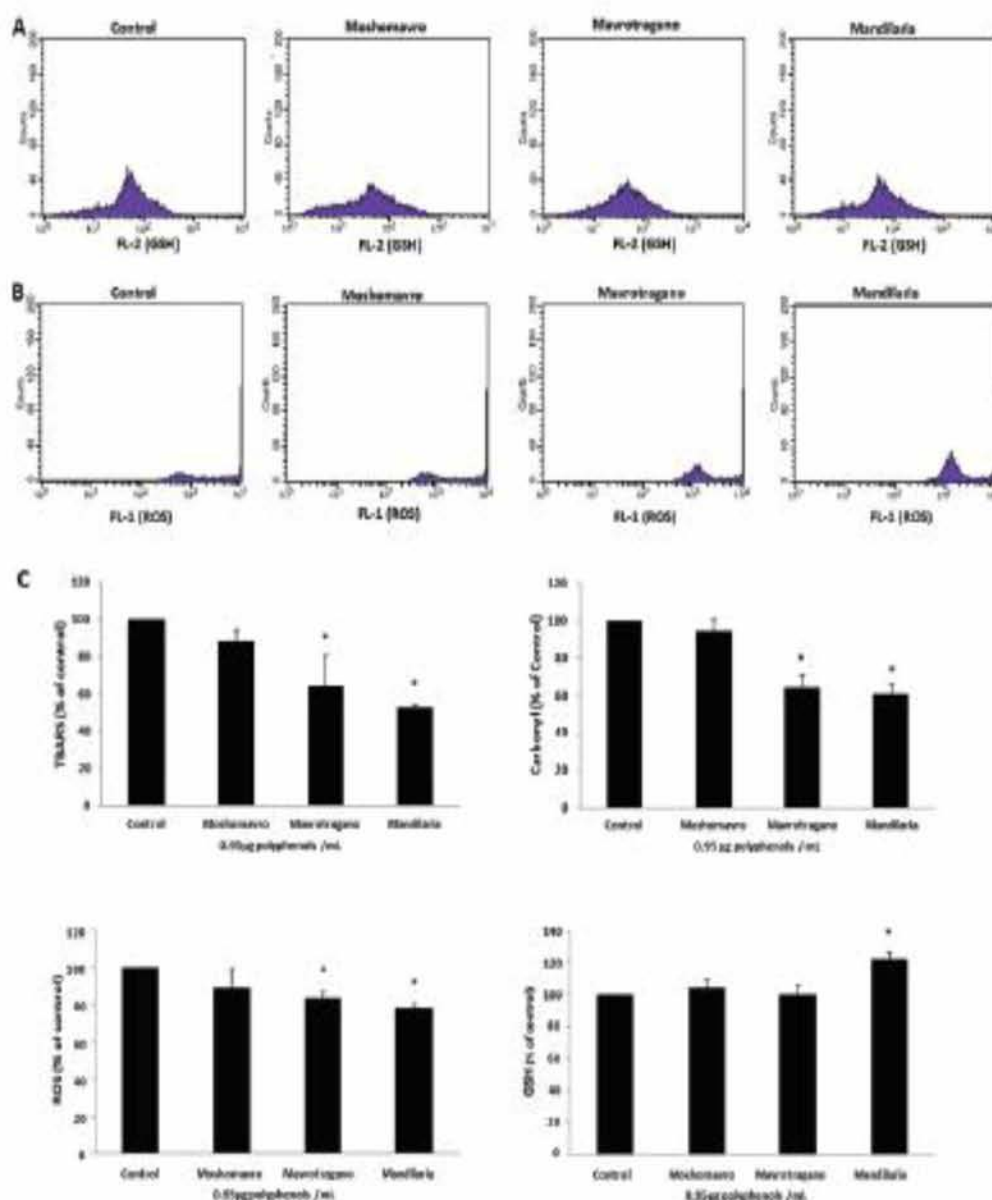


Figure 4. Effects of treatment with grape stem extracts for 24 h on the levels of oxidative stress markers in C2C12 cells. (A) The histogram of cell counts versus fluorescence of 10,000 cells analyzed by the flow cytometry for the detection of glutathione (GSH) levels. FL-2 represents the detection of fluorescence using 488 and 580 nm as the excitation and emission wavelength, respectively. (B) The histograms show the cell counts versus fluorescence of 10,000 cells analyzed by the flow cytometry for the detection of reactive oxygen species (ROS) levels. FL-1 represents the detection of fluorescence using 488 and 580 nm as the excitation and emission wavelength, respectively. (C) Effects on ROS, glutathione (GSH), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and protein carbonyl (CARB) levels. TBARS and CARB levels were assessed using a spectrophotometer. All values are presented as the means  $\pm$  SEM of three independent experiments. \* $p < 0.05$  indicates significant difference compared to the controls (untreated cells).

pomace (20,31,32). Of note, in previous studies of ours, we demonstrated that grape stems, a by-product produced in large amounts (approximately 5% of the original grape material) during the vinification process, which has been little investigated, contained bioactive phytochemicals and presented important biological activities (15,24). In particular, we demonstrated that grape stem extracts exhibited strong antioxidant activity *in vitro* comparable even to that of grape seed

extracts (15). In the present study, we investigated at a cellular level (i.e., in endothelial and muscle cells) the antioxidant activity of stem extracts from Greek grape varieties.

Before examining the effects of grape stem extracts on the redox status of cells, their potency of scavenging free radicals *in vitro* was assessed. As also demonstrated in a previous study of ours (15), in this study, the tested grape stem extracts were very potent scavengers of DPPH $^{\cdot}$  and ABTS $^{\cdot}$  radicals. In both



DPPH and ABTS assays, Mandilaria extract was the most potent and Moshomavro extract the weakest. Thus, although the three tested extracts had similar TPC values, their ability to scavenge free radicals varied greatly. Specifically, Mandilaria extract was almost 2-fold more potent as scavenger against DPPH<sup>•</sup> and ABTS<sup>•+</sup> radicals than Moshomavro extract. This discordance between the TPC values and free radical scavenging activity is in agreement with the results of our previous study in which the TPC values of 12 grape stem extracts had a weak correlation with their free radical scavenging activity (15). This lack of correlation between the TPC values and free radical scavenging activity suggests that the qualitative polyphenolic composition of the stem extracts may be more important than their quantitative polyphenolic content for their antioxidant potency. For example, it has been suggested that polyphenolic extracts exhibiting high antioxidant activity have a high content of special polyphenols, such as *trans*-resveratrol, gallic acid, quercetin, (+)-catechin, (-)-epicatechin and rutin that are very labile to oxidation, and thus can potentially scavenge free radicals before they are able to attack and damage other macromolecules (33-35). Indeed, Mandilaria extract contained at least 2-fold greater amounts of *trans*-resveratrol, gallic acid and quercetin than Moshomavro extract.

Moreover, the reducing power of the grape stem extracts was examined. The reducing power of a substance is associated with its antioxidant activity, since it indicates that the substances are electron donors and can reduce the oxidized intermediates of the lipid peroxidation processes, so that they can act as primary and secondary antioxidants (36). All the three grape stem extracts at increasing concentrations showed increased reducing power. As in free radical scavenging assays, Mandilaria extract exhibited the greatest reducing power, but in this case, along with Mavrottragano extract. Again, it was observed that apart from the similar TPC values of the grape stem extracts, the Mandilaria and Mavrottragano extracts had 2-fold greater reducing power than the Moshomavro extract. This difference may be attributed to the differences in the polyphenolic composition of the tested extracts. For example, a previous study reported that proanthocyanidins, a class of oligomeric flavonoids, of grape stem extracts were mainly responsible for reducing power possibly due to the relatively high number of hydroxyl groups that their monomer units contain (37).

As mentioned above, in this study, the antioxidant activity of grape stem extracts was also examined at a cellular level, specifically in endothelial and muscle cells. In a previous study, we demonstrated that grape extracts from pomace improved the redox status of EA.hy926 and C2C12 cells (21). Pomace is also a by-product of the winemaking process, but it includes, apart from the stems, the seeds and skins as well. To the best of our knowledge, this is the first study on the effects of grape extracts from stems on the redox status of endothelial and muscle cells. Two of the tested extracts, the Mandilaria and Mavrottragano extracts, improved the redox status of the endothelial and muscle cells, since they reduced lipid peroxidation, as shown by the decrease in TBARS levels. Moreover, the Mandilaria and Mavrottragano extracts diminished protein oxidation, as shown by the decrease in CARB levels in the EA.hy926 and C2C12 cells. However, the Moshomavro extract was the only one of the tested extracts that did not decrease the CARB and TBARS

levels compared to the untreated cells in either the EA.hy926 or C2C12 cells.

The reduction of protein oxidation and lipid peroxidation by the Mandilaria and Mavrottragano extracts may be attributed to their ability to reduce ROS levels, particularly in muscle cells. The direct free radical scavenging activity and reducing power of the Mandilaria and Mavrottragano extracts may account at least in part for their capacity to decrease ROS levels in muscle cells. On the contrary, these two extracts did not affect the ROS levels in EA.hy926 endothelial cells, possibly due to the fact that the concentrations of the extracts used in these cells were lower than those used in C2C12 muscle cells. The Moshomavro extract did not alter the ROS levels in either the endothelial or muscle cells. Remarkably, Moshomavro extract was also the least potent extract in free radical scavenging and reducing power assays.

The decrease in ROS-induced damage of lipids and proteins by the Mandilaria and Mavrottragano extracts in endothelial cells may also be explained by their ability to enhance antioxidant mechanisms, such as GSH. However, in the muscle cells, only the Mandilaria extract increased GSH levels, indicating that this extract was the most potent for GSH induction. The Moshomavro extract, which did not decrease the TBARS, CARB and ROS levels was also unable to increase the GSH levels in either the endothelial or in muscle cells. The increase in GSH levels by grape stem extracts is of particular importance, since GSH, the most abundant non-protein thiol source in cells, is one of the major intracellular antioxidant molecules protecting against oxidative stress (38). In previous studies of ours, we demonstrated that GSH was a key molecule for the antioxidant activity of a grape pomace extract in both EA.hy926 and C2C12 cells (20,21). Specifically, grape pomace extract was shown to increase GSH levels and the expression or activity of enzymes involved in synthesis ( $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase) and metabolism (e.g., glutathione S-transferase) of GSH (20,21).

As the results from the assessment of the oxidative stress markers showed, there were differences in the effects of the tested stem extracts on the redox status of the cells. These differences of the extracts were profoundly attributed to their polyphenolic composition. This conclusion is supported by the fact that the concentrations of all the three extracts had the same TPC values in the cellular experiments. Thus, it was excluded that the observed differences in the antioxidant activity between the extracts may be due to their different amount of polyphenols. Among the tested extracts, the Moshomavro extract exhibited much less potency for improving the redox status of the cells compared to the Mandilaria and Mavrottragano extracts. The Moshomavro extract also had less amounts of gallic acid, (+)-catechin, ferulic acid and *trans*-resveratrol than the Mandilaria and Mavrottragano extracts, and thus these polyphenols may account, at least in part, for the higher antioxidant activity of the latter two extracts. For example, a previous study demonstrated that the *trans*-resveratrol increased GSH levels and decreased oxidative stress-induced intracellular ROS and malondialdehyde (MDA) production in vascular smooth muscle cells (39). Gallic acid has also been shown to reduce ROS levels in vascular smooth muscle cells and their corresponding mediator p47phox, a molecule translocating to the membrane and inducing O<sub>2</sub><sup>•-</sup> production (40). Moreover, in rat vascular smooth muscle cells, ferulic acid has been shown to decrease lipid



peroxidation and increase the activity of antioxidant enzymes (e.g., superoxide dismutase) (41). Between the Mandilaria and Mavrotragano extracts, the former exhibited more potent antioxidant activity. As regards the differences in the polyphenolic composition between these two extracts, Mandilaria had higher amounts of caffeic acid, coumaric acid, quercetin and kaempferol. Among these polyphenols, caffeic acid has been reported to decrease  $O_2^{\cdot-}$  levels at very low concentrations (100–1,000 nM) in human umbilical vein-derived endothelial cells under oxidative stress conditions (42). Furthermore, quercetin and kaempferol have been shown to reduce  $O_2^{\cdot-}$  levels in rat vascular smooth muscle cells through the inhibition of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH)-oxidase activity, the main source of  $O_2^{\cdot-}$  in the vessel wall (43).

In conclusion, to the best of our knowledge, the findings of the present study indicate for the first time that grape stem extracts at low concentrations improve the redox status of endothelial and muscle cells. Therefore, grape stem extracts may be used, for instance, in the development of antioxidant food supplements used for counteracting oxidative stress-induced pathological conditions in endothelial or skeletal muscles. However, it was shown that the antioxidant activity of the grape stem extracts depended on their qualitative polyphenolic composition. For example, considerable amounts of polyphenols, such as *trans*-resveratrol, gallic acid, (+)-catechin, ferulic acid, caffeic acid, quercetin, coumaric acid and kaempferol may be essential for the observed antioxidant activity of the stem extracts. The knowledge of the polyphenolic composition that is responsible for a strong antioxidant activity would help to assess the quality of grape stem extracts intended for uses as antioxidant supplements.

# Acknowledgements

This study was funded in part by the MSc programmes 'Biotechnology-Nutrition and Environment' and 'Molecular Biology and Genetics Applications' in the Department of Biochemistry and Biotechnology at the University of Thessaly.

# References

- Halliwel B: Free radicals and other reactive species in disease. In: *Nature Encyclopaedia of Life Sciences*. J. Wiley and Sons (eds). Nature Publishing Group, New York, 2001.
- Reid MB: Free radicals and muscle fatigue: Of ROS, canaries, and the IOC. *Free Radic Biol Med* 44: 169–179, 2008.
- Nunes-Silva A, Bernardes PT, Rezende BM, Lopes F, Gomes HC, Marques PE, Lima PM, Coimbra CC, Meneses GB, Teixeira MM, *et al.* Treadmill exercise induces neutrophil recruitment into muscle tissue in a reactive oxygen species-dependent manner. An intravital microscopy study. *PLoS One* 9: e96464, 2014.
- Di Meo S and Venditti P: Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. *Biol Signals Recept* 10: 125–140, 2001.
- Deanfield JE, Halcox JP and Rabelink TJ: Endothelial function and dysfunction: Testing and clinical relevance. *Circulation* 115: 1285–1295, 2007.
- Vicente VM, Rocha M, Solé E, Bafuls C, García-Malpartida K and Hernández-Mijares A: Oxidative stress, endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Curr Pharm Des* 15: 2988–3002, 2009.
- Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M and Kihara Y: Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73: 411–418, 2009.
- Kokura S, Wolf RE, Yoshikawa T, Granger DN and Aw TY: Molecular mechanisms of neutrophil-endothelial cell adhesion induced by redox imbalance. *Circ Res* 84: 516–524, 1999.
- Zou Y, Yoon S, Jung KJ, Kim CH, Son TG, Kim MS, Kim YJ, Lee J, Yu BP and Chung HY: Upregulation of aortic adhesion molecules during aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61: 232–244, 2006.
- Rhee SG: Cell signaling.  $H_2O_2$ , a necessary evil for cell signaling. *Science* 312: 1882–1883, 2006.
- Woywodt A, Bahlmann FH, De Groot K, Haller H and Hahnbitz M: Circulating endothelial cells: Life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol Dial Transplant* 17: 1728–1730, 2002.
- Matthaios CM, Goutzourelas N, Stagos D, Sarafoglou E, Jamurtas A, Kouloucheri SD, Haroutounian SA, Tsatsakis AM and Kourtas D: Pomegranate juice consumption increases GSH levels and reduces lipid and protein oxidation in human blood. *Food Chem Toxicol* 73: 1–6, 2014.
- Kerasioti E, Kiskini A, Veskoukis A, Jamurtas A, Tsitsimpikou C, Tsatsakis AM, Koutedakis Y, Stagos D, Kourtas D and Karathanos V: Effect of a special carbohydrate-protein cake on oxidative stress markers after exhaustive cycling in humans. *Food Chem Toxicol* 50: 2805–2810, 2012.
- Bagchi D, Swaroop A, Preuss HG and Bagchi M: Free radical scavenging, antioxidant and cancer chemoprevention by grape seed proanthocyanidin: An overview. *Mutat Res* 768: 69–73, 2014.
- Apostolou A, Stagos D, Galitsiou E, Spyrou A, Haroutounian S, Portenis N, Tringolou I, Wallace Hayes A, Tsatsakis AM and Kourtas D: Assessment of polyphenolic content, antioxidant activity, protection against ROS-induced DNA damage and anticancer activity of *Vitis vinifera* stem extracts. *Food Chem Toxicol* 61: 60–68, 2013.
- Spanou C, Veskoukis AS, Stagos D, Liadaki K, Anastasiadi M, Haroutounian SA, Tsouka M, Tzanakoulis E and Kourtas D: Effects of grape extracts on the in vitro activity of enzymes involved in oxidative stress regulation. *In Vivo* 25: 657–662, 2011.
- Stagos D, Kazantzoglou G, Magiatis P, Mitaku S, Anagnostopoulos K and Kourtas D: Effects of plant phenolics and grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* on mitomycin C and topoisomerase I-induced nicking of DNA. *Int J Mol Med* 15: 1013–1022, 2005.
- Stagos D, Kazantzoglou G, Theofanidou D, Kakalopoulou G, Magiatis P, Mitaku S and Kourtas D: Activity of grape extracts from Greek varieties of *Vitis vinifera* against mutagenicity induced by bleomycin and hydrogen peroxide in *Salmonella typhimurium* strain TA102. *Mutat Res* 609: 165–175, 2006.
- Stagos D, Spanou C, Margariti M, Stathopoulos C, Mamuris Z, Kazantzoglou G, Magiatis P and Kourtas D: Cytogenetic effects of grape extracts (*Vitis vinifera*) and polyphenols on mitomycin C-induced sister chromatid exchanges (SCEs) in human blood lymphocytes. *J Agric Food Chem* 55: 5246–5252, 2007.
- Goutzourelas N, Stagos D, Housmekeridou A, Karapoulou C, Kerasioti E, Aligiannis N, Skaltsounis AL, Spandidos DA, Tsatsakis AM and Kourtas D: Grape pomace extract exerts antioxidant effects through an increase in GCS levels and GST activity in muscle and endothelial cells. *Int J Mol Med* 36: 433–441, 2015.
- Goutzourelas N, Stagos D, Demertzis N, Mavridou P, Karateroliti H, Georgiadakis S, Kerasioti E, Aligiannis N, Skaltsounis I, Statiri A, *et al.* Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. *Hum Exp Toxicol* 33: 1099–1112, 2014.
- Anastasiadi M, Chorianopoulos NG, Nychas GJ and Haroutounian SA: Antilisterial activities of polyphenol-rich extracts of grapes and vinification byproducts. *J Agric Food Chem* 57: 457–463, 2009.
- Sahpazidou D, Geromichalos GD, Stagos D, Apostolou A, Haroutounian SA, Tsatsakis AM, Tzanakakis GN, Hayes AW and Kourtas D: Anticarcinogenic activity of polyphenolic extracts from grape stems against breast, colon, renal and thyroid cancer cells. *Toxicol Lett* 230: 218–224, 2014.
- Stagos D, Apostolou A, Poullos E, Kermeliotou E, Mpatzilioti A, Kretsouli K, Kouloucheri SD, Haroutounian SA and Kourtas D: Antiangiogenic potential of grape stem extract through inhibition of vascular endothelial growth factor expression. *J Physiol Pharmacol* 63: 843–852, 2014.
- Kantsadi AL, Apostolou A, Theofanous S, Stravodimos GA, Kyriaki E, Georgiades VA, Chatzileontiadou DS, Pegiou K, Skamnakis VT, Stagos D, *et al.* Biochemical and biological assessment of the inhibitory potency of extracts from vinification byproducts of *Vitis vinifera* against glycogen phosphorylase. *Food Chem Toxicol* 67: 35–43, 2014.



26. Zhu L, Zhang Y, Deng J, Li H and Lu J: Phenolic concentrations and antioxidant properties of wines made from north american grapes grown in china. *Molecules* 17: 3304-3323, 2012.
27. Meng JF, Fang YL, Qin MY, Zhuang XF and Zhang ZW: Varietal differences among the phenolic profiles and antioxidant properties of four cultivars of spine grape (*Vitis davidii* Foex) in Chongyi County (China). *Food Chem* 134: 2049-2056, 2012.
28. Kerasioti E, Stagos D, Priftis A, Aivazidis S, Tsatsakis AM, Hayes AW and Kourtas D: Antioxidant effects of whey protein on muscle C2C12 cells. *Food Chem* 153: 271-278, 2014.
29. Keles MS, Taysi S, Sen N, Aksoy H and Akay F: Effect of corticosteroid therapy on serum and CSF malondialdehyde and antioxidant proteins in multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 28: 141-143, 2001.
30. Patsoukis N, Zervoudakis G, Panagopoulos NT, Georgiou CD, Angelatos F and Matsakis NA: Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylene-tetrazol-induced epileptic seizure. *Neurosci Lett* 357: 83-86, 2004.
31. Feringa HH, Laskey DA, Dickson JE and Coleman CI: The effect of grape seed extract on cardiovascular risk markers: A meta-analysis of randomized controlled trials. *J Am Diet Assoc* 111: 1173-1181, 2011.
32. Sei Hasiba PS, Mesias M, Lavelli V and Morales FJ: Grape skin extracts from winemaking by-products as a source of trapping agents for reactive carbonyl species. *J Sci Food Agric* (In press).
33. Alov P, Tkakovska I and Pajeva I: Computational studies of free radical-scavenging properties of phenolic compounds. *Curr Top Med Chem* 15: 85-104, 2015.
34. Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM and Li HB: Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients* 6: 6020-6047, 2014.
35. Yoshimura M: Structure elucidation of antioxidative polyphenols and their biological properties. *Yakugaku Zasshi* 134: 957-964, 2014 (In Japanese).
36. Chanda S and Dave R: In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *Afr J Microbiol Res* 3: 983-996, 2009.
37. Karvela E, Makris DP, Kalogeropoulos N and Karathanos VT: Deployment of response surface methodology to optimise recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem polyphenols. *Talanta* 79: 1311-1321, 2009.
38. Livingstone C and Davis J: Targeting therapeutics against glutathione depletion in diabetes and its complications. *Br J Diabetes Vasc Dis* 7: 258-265, 2007.
39. Guo R, Li W, Liu B, Li S, Zhang B and Xu Y: Resveratrol protects vascular smooth muscle cells against high glucose-induced oxidative stress and cell proliferation in vitro. *Med Sci Monit Basic Res* 20: 82-92, 2014.
40. Yang HL, Huang PJ, Liu YR, Kumar KJ, Hsu LS, Lu TL, Chia YC, Takajo T, Kazunori A and Hsu YC: Toona sinensis inhibits LPS-induced inflammation and migration in vascular smooth muscle cells via suppression of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2014: 901315, 2014.
41. Wu L, Li X, Li Y, Wang L, Tang Y and Xue M: Proliferative inhibition of danxiongfang and its active ingredients on rat vascular smooth muscle cell and protective effect on the VSMC damage induced by hydrogen peroxide. *J Ethnopharmacol* 126: 197-206, 2009.
42. Migliori M, Cantalupi V, Mannari C, Bertelli AA, Medica D, Quercia AD, Navarro V, Scatena A, Giovannini L, Biancone L, et al: Caffeic acid, a phenol found in white wine, modulates endothelial nitric oxide production and protects from oxidative stress-associated endothelial cell injury. *PLoS One* 10: e0117530, 2015.
43. Jimenez R, Lopez-Sepulveda R, Romero M, Toral M, Cogolludo A, Perez-Vizcaino F and Duarte J: Quercetin and its metabolites inhibit the membrane NADPH oxidase activity in vascular smooth muscle cells from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Food Funct* 6: 409-414, 2015.